

Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von E2F3

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Humanbiol. Björn von Eyß,

geboren am 23.02.1980 in Lahnstein

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Achim Leutz

2. Prof. Dr. Claus Scheidereit

3. Prof. Dr. Thomas Sommer

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Frau Dr. Ulrike Ziebold am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt.

ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY (ENGLISH).....	7
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Der Zellzyklus	8
1.2 Die Rolle des pRB/E2F-Signalwegs für den Zellzyklus und in der Tumorigenese	9
1.3 Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren	11
1.4 Die Familie der <i>Pocket Proteine</i>	14
1.5 <i>Knockout</i> -Studien über den pRB/E2F-Signalweg	15
1.6 Der <i>E2F3</i> -Genlocus	17
1.7 E2F-Zielgene.....	19
1.8 E2Fs und Chromatinregulation	19
1.9 <i>Chromatin Remodelling</i> -Faktoren in der Transkriptionskontrolle	23
1.10 HELLS ist eine SNF2-ähnliche Helikase	26
1.11 HELLS reguliert die genomweite DNA-Methylierung	27
1.12 Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Material	30
2.1.1 Chemikalien	30
2.1.2 Puffer und Lösungen	30
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide	37
2.1.4 Plasmide	41
2.1.5 Antikörper	43
2.1.6 Generelle Laborgeräte	44

2.2 Zellbiologische Methoden	45
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	51
2.4 Biochemische Methoden	55
3 ERGEBNISSE	67
3.1 HELLS ist ein neuer essenzieller Kofaktor von E2F3.....	67
3.1.1 Ermittlung neuer Interaktionspartner mittels <i>GST-Pulldown</i>	67
3.1.2 HELLS interagiert mit E2F3a/b <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	69
3.1.3 HELLS interagiert mit der <i>Marked Box</i> -Domäne von E2F3	71
3.1.4 E2F3 interagiert mit dem N-Terminus von HELLS.....	72
3.1.5 HELLS bindet an die Promotoren von E2F-Zielgenen	73
3.1.6 E2F3 und HELLS binden gemeinsam an den p107 Promotor	74
3.1.7 E2F3 rekrutiert HELLS zu Promotoren	75
3.1.8 HELLS-Depletion in asynchron wachsenden Zellen führt zu keinem Effekt auf die Expression von E2F-Zielgenen.....	80
3.1.9 HELLS ist essenziell für den Wiedereintritt in die S-Phase nach Quieszenz	82
3.1.10 E2F3 benötigt HELLS zur Aktivierung seiner Zielgene	87
3.1.11 HELLS ist selbst ein direktes E2F-Zielgen	89
3.1.12 HELLS und E2F3 sind in aggressiven Prostatakarzinomen hochreguliert	90
3.2 Identifizierung neuer E2F3-Zielgene per ChIP-Seq.....	93
3.2.1 Identifizierung neuer proteinkodierender E2F3-Zielgene	93
3.2.2 Identifizierung von E2F3-regulierten miRNA-Promotoren	95
3.2.3 E2F3 bindet an die Promotoren von Regulatoren der miRNA-Biogenese	96
4 DISKUSSION	98
4.1 Identifizierung neuer E2F3-Interaktionspartner per GST-Pulldown	98
4.1.1 E2F3 interagiert mit der SNF2-ähnlichen Helikase HELLS.....	99
4.1.2 E2F3 kann HELLS zu Promotoren von E2F-Zielgenen rekrutieren.....	100
4.1.3 E2F3 benötigt HELLS zur Aktivierung seiner Zielgene	101
4.1.4 HELLS-Depletion führt zu einem verlangsamten Eintritt in die S-Phase	102
4.1.5 <i>HELLS</i> ist selbst ein direktes E2F-Zielgen	103
4.1.6 HELLS und E2F3 sind in fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms überexprimiert	104
4.1.7 Modell.....	105

4.2 Identifizierung neuer E2F3-Zielgene durch ChIP-Seq	109
ANHANG.....	112
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
DANKSAGUNG	121
ERKLÄRUNG.....	123
PUBLIKATIONSLISTE	124
QUELLENVERZEICHNIS	126

Zusammenfassung

Der pRB/E2F-Signalweg ist ein zentraler Regulator der Proliferationskontrolle in Säugerzellen, der in fast allen auftretenden Tumoren dereguliert ist. Durch unterschiedliche Mutationen in Komponenten dieses Signalwegs kommt es letzten Endes zu einer erhöhten Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren und somit zu einer verstärkten Transkription von E2F-Zielgenen in diesen Tumoren.

Um die molekularen Mechanismen der Rolle von E2F3 in der Zellzykluskontrolle und der Tumorigenese besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit per *GST-Pulldown* mit anschließender Massenspektrometrie neue potenzielle Interaktionspartner von E2F3 identifiziert. Ein identifizierter Interaktionspartner war die SNF2-ähnliche Helikase HELLS. HELLS interagiert *in vitro* und *in vivo* spezifisch mit der Marked Box-Domäne von E2F3, aber nicht mit anderen untersuchten E2F-Transkriptionsfaktoren, wie durch GST-Interaktionsstudien und Ko-Immunpräzipitationsexperimente demonstriert werden konnte. Durch Chromatin-Immunpräzipitation konnte zusätzlich gezeigt werden, dass E2F3 für die Rekrutierung von HELLS an E2F-regulierte Promotoren wie z. B. *CDC6* oder *p107* verantwortlich ist. Die shRNA-vermittelte Depletion von HELLS führte zu einer stark verminderten Induktion von allen untersuchten E2F-Zielgenen nach Serumstimulation und einem verspäteten Eintritt in die S-Phase der HELLS-depletierten Zellen, was zeigt, dass HELLS essenziell für die Induktion von E2F-Zielgenen ist.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der E2F3- und HELLS-Expression in humanen Prostatakarzinomen zeigte sich, dass sowohl E2F3 als auch HELLS in späten aggressiven Stadien dieser Tumore sehr stark exprimiert sind, jedoch nur sehr schwach in den weniger aggressiven Tumoren.

Diese Versuche zeigen, dass es sich bei HELLS um einen neuen Bestandteil des pRB/E2F-Signalwegs handelt, der eventuell in der Entstehung gewisser Tumorarten eine Rolle spielt und somit ein neues potenzielles Ziel für neuartige Krebstherapien darstellt.

Schlagwörter: E2F3, HELLS, Zellzyklus, Chromatin-Remodelling

Summary (English)

The pRB/E2F pathway is a key regulator of proliferation in mammalian cells and is commonly mutated in human tumors. These mutations in the components of the pRB/E2F pathway lead to deregulated activity of the E2F transcription factors resulting in increased expression of E2F target genes.

To further understand the molecular mechanisms of E2F3 in cell cycle control and its role in tumorigenesis new interaction partners for E2F3 were identified in the course of this thesis with the help of a GST-Pulldown approach coupled to mass spectrometric analysis. One of the identified interaction partners was the SNF2-like helicase HELLS. With the help of GST-interaction studies and Co-Immunoprecipitation assays it could be demonstrated that HELLS interacts specifically with E2F3 *via* its Marked Box domain but does not bind to the other investigated E2F transcription factors. HELLS could be detected at E2F target genes like *p107* and *CDC6* *in vivo* with the help of Chromatin-Immunoprecipitation assays. Furthermore, the forced recruitment of E2F3 to E2F target genes led to an enhanced binding of HELLS to these promoters suggesting that HELLS is recruited to E2F target genes *via* protein-protein interaction with E2F3.

The shRNA-mediated depletion of HELLS led to a strongly reduced induction of E2F target genes and a delay in S-phase entry, showing that HELLS is essential for the induction of E2F target genes.

During the immunohistochemical analysis of human prostate cancer specimens it became evident that both E2F3 and HELLS are strongly expressed in the more aggressive late stages but only weakly expressed in the early stages of this tumor type.

These findings demonstrate that HELLS is a new component of the E2F/pRB pathway which might play a role in the development of certain tumors and might represent a new target for novel cancer therapies.

Keywords: E2F3, HELLS, Cell cycle, Chromatin remodelling

1 Einleitung

Jeden Tag vollziehen sich in unserem Körper eine Vielzahl von Zellteilungen, bei der eine Zelle ihr Genom verdoppelt, welches anschließend auf zwei Tochterzellen verteilt wird. Die Entscheidung, ob und wann sich eine Zelle teilt, hängt bei mehrzelligen Lebewesen vor allen Dingen von extrazellulären Stimuli, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren ab. Es ist offensichtlich, dass der Prozess der Zellteilung einer strengen Kontrolle bedarf, da im adulten Organismus die Zellzahl unter physiologischen Bedingungen konstant gehalten werden muss. Somit ist es unerlässlich, dass sich im Laufe der Entwicklung ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Apoptose einstellt. Diese beiden Prozesse spielen nicht nur bei der Homöostase der Zellzahl, sondern auch bei pathologischen Prozessen, wie der Entstehung von Tumoren, eine wichtige Rolle. So zeigen Tumore fast immer eine Resistenz gegenüber proapoptotischen Stimuli und ein unkontrolliertes Zellwachstum [1]. Aus diesem Grund ist das molekulare Verständnis dieser Prozesse essenziell, um in Zukunft effektivere Therapie-möglichkeiten für maligne Erkrankungen zu entwickeln.

1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst in fast allen eukaryontischen Organismen die gleichen Phasen: G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und die Mitose (s. Abb. 1.1). Die Benennung der G₁- und G₂-Phase (für engl. *gap* = Lücke) erfolgte historisch, da in dieser Phase weder eine messbare Neusynthese von DNA noch eine Mitose zu beobachten war. Die *gap*-Phasen dienen unter anderem als Kontrollpunkte. So arretieren Zellen in der G₁-Phase nach DNA-Schädigung, um der Zelle zu erlauben diese Schäden zu beheben bevor die Zelle in die S-Phase übergeht, in der sich mögliche

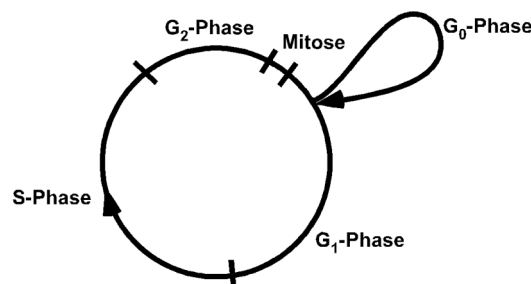


Abb. 1.1: Der Zellzyklus

Mutationen irreversibel manifestieren könnten [2] . Nach Entzug von Wachstumsfaktoren (auch Mitogene genannt) können Zellen in die G_0 -Phase übergehen [3] , in der sie verharren können, bis sie wieder stimuliert werden und erneut in den Zellzyklus eintreten. Dieser arretierte Zustand, der auch als Quieszenz bezeichnet wird, ist von der Seneszenz zu unterscheiden, der einen nahezu irreversiblen Wachstumsarrest darstellt. Seneszenz kann durch viele verschiedene Faktoren wie onkogenen Stress [4] oder oxidativen Stress in der Zellkultur [5] induziert werden. Diese biologischen Prozesse werden unter anderem von dem so genannten pRB/E2F-Signalweg reguliert, wie im Folgenden genauer erläutert wird.

1.2 Die Rolle des pRB/E2F-Signalwegs für den Zellzyklus und in der Tumorigenese

Der pRB/E2F-Signalweg ist der zentrale Signalweg, der kontrolliert, ob eine Zelle aus der G_0 - oder G_1 -Phase in die S-Phase übertritt [6] . E2F als Transkriptionsfaktor reguliert direkt eine Vielzahl von Genen, die benötigt werden, um in die S-Phase überzugehen, während das Retinoblastomprotein (pRB) diese Aktivität durch Interaktion mit E2F inhibieren kann (s. Abb. 1.2). Dadurch verhindert pRB in der G_0 -Phase die Aktivierung von E2F-Zielgenen und wirkt somit als Tumorsuppressor [7] .

Wird eine quieszente Zelle mit Serum induziert, kommt es durch mitogene Signaltransduktion zur transkriptionellen Aktivierung von Cyclinen des D-Typs [8, 9] und später auch der E-Typ Cycline [10] . Diese Cycline assoziieren daraufhin mit ihren jeweiligen cyclinabhängigen Kinasen (CDKs = engl. für *cyclin-dependent kinases*), wobei D-Typ Cycline mit CDK4 und CDK6 [11, 12] und E-Typ Cycline mit CDK2 [13] assoziieren. Diese heterodimeren Komplexe phosphorylieren wiederum multiple Aminosäurereste in pRB [14, 15, 16] , wodurch die Bindung an E2F-Proteine aufgehoben wird und diese daraufhin ihre Zielgene aktivieren können.

Die zentrale Rolle des pRB/E2F-Signalwegs in der Zellzykluskontrolle wird in Abb. 1.2 deutlich. Hier ist schematisch der pRB/E2F-Signalweg in stark vereinfachter Form dargestellt. Auffallend ist, dass sehr viele andere Signaltransduktionskaskaden, wie zum Beispiel der TGF-beta-Signalweg, mit dem pRB/E2F-Signalweg verbunden sind, so dass dieser als Integrationsplattform von all diesen Wegen dient und als Endpunkt für die Zellzykluskontrolle fungiert.

Als Mediatoren von den jeweiligen Signaltransduktionswegen fungieren sehr häufig kleine CDK-Inhibitoren (CKIs). Man kann diese Proteine in zwei Familien einteilen: die CIP-Familie und die Familie der INK4-Proteine. Die CIP-Familie (engl.: *CDK inhibitory proteins*) umfasst die Mitglieder $p21^{CIP1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$. Diese Proteine bilden mit den Cyclin-CDK-Komplexen einen ternären Komplex und inhibieren deren katalytische Aktivität [17, 18]. Die Mitglieder der INK4-Familie (engl.: *inhibitors of kinase 4*) hingegen, bestehend aus $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$, $p18^{INK4C}$ und $p19^{INK4D}$, binden nur an die CDK4/6-Untereinheit und verhindern die Dimerisierung mit dem entsprechenden Cyclin [19, 20].

Sowohl die Aktivierung des p53-Signalwegs, der unter anderem nach DNA-Schädigung aktiviert wird, als auch des TGF-beta-Signalwegs führen zu einer transkriptionellen Aktivierung des $p21^{CIP1}$ -Zellzyklusinhibitors [21, 22]. Dies hat zur Folge, dass pRB in hypophosphoryliertem Zustand vorliegt und somit die E2F-Proteine inaktiviert werden. Ein weiterer zellulärer Prozess, bei dem der pRB/E2F-Signalweg eine wichtige Rolle einnimmt, ist die schon zuvor kurz erwähnte Seneszenz. Werden primäre Zellen, z. B. embryonale Mausfibroblasten (MEFs), in Kultur genommen, kommt es nach wenigen Passagen bei der so genannten replikativen Seneszenz zur Induktion von zwei potenten Zellzyklusinhibitoren: $p19^{Arf}$ und dem INK4-Protein $p16^{INK4A}$ [23]. $p19^{Arf}$ führt über den p53-Signalweg zur Induktion von dem CIP-Protein $p21^{CIP1}$ [24]. Die Induktion dieser beiden Zellzyklusinhibitoren führt schließlich zu einem stabilen Zellzyklusarrest in der G1-Phase [25], in dem die Zellen arretiert sind. Diese Zellen können allerdings durch akute Inaktivierung des pRB-Proteins wieder in den Zellzyklus gebracht werden [26]. Dies unterstreicht die zentrale Rolle des pRB-Proteins als Tumorsuppressor, da inzwischen bekannt ist, dass Seneszenz auch einen wirksamen Schutzmechanismus gegen Onkogene darstellt. So werden die gleichen Signaltransduktionsmechanismen auch nach der Aktivierung von onkogenem Ras^{V12} bei der prematuren Seneszenz [4] verwendet, um die Zelle irreversibel zu arretieren und somit den Organismus vor der Ausbreitung dieser potenziell onkogenen Zelle zu schützen [27, 28, 29, 30].

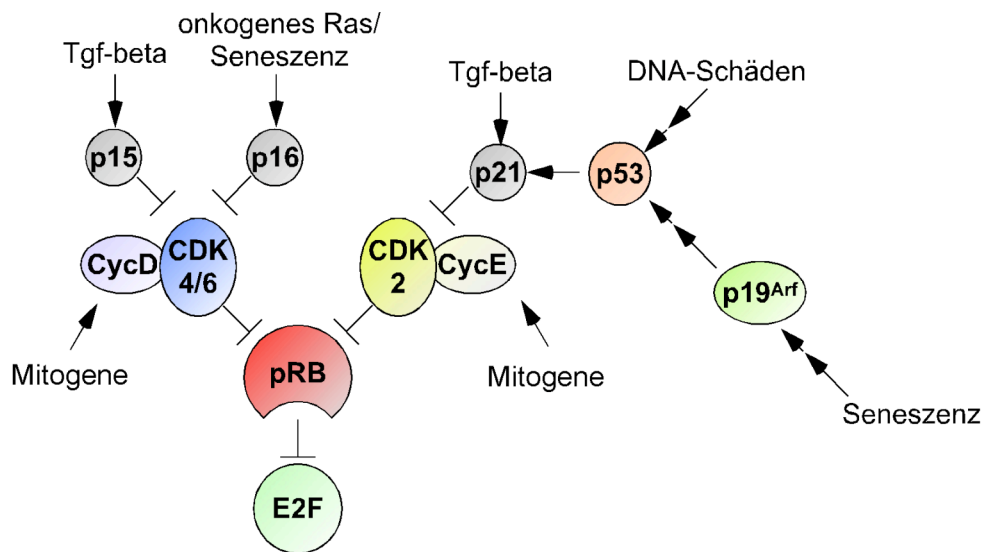


Abb. 1.2: Überblick über den pRB/E2F-Signalweg

Dies erklärt, warum vermutlich alle auftretenden Tumore Mutationen in dem pRB/E2F-Signalweg tragen. Wie in Abb. 1.2 deutlich wird, handelt es sich bei dem pRB/E2F-Signalweg um einen komplexen Signaltransduktionsweg mit vielen verschiedenen Komponenten. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Signalweg in verschiedenen Tumoren auf unterschiedliche Art und Weise dereguliert sein kann. Man findet z. B. häufig p16^{INK4A}-Verlust in Melanomen [31], Cyclin D1-Amplifikation in Brusttumoren [32] oder E2F3-Amplifikation in Harnblasentumoren [33, 34].

1.3 Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren

Der Name der E2F-Transkriptionsfaktoren ist darauf zurückzuführen, dass sie als zellulärer Faktor identifiziert wurden, der an den frühen adenoviralen E2-Promotor bindet [35, 36]. Daher wurde dieser infolgedessen E2F (engl.: *E2 factor*) benannt. Im Jahr 1992 wurde schließlich das erste E2F kloniert. Es wurde unabhängig von zwei Laboren als ein pRB-bindender Faktor durch einen *yeast two hybrid screen* identifiziert und wurde dementsprechend E2F1 genannt [37, 38].

Inzwischen wurden sieben weitere E2F-Transkriptionsfaktoren identifiziert, so dass es sich um eine ganze Familie von Transkriptionsfaktoren handelt. Sie können sich zum Teil sehr im Aufbau unterscheiden, aber allen gemeinsam ist das DNA-Bindungsmotiv, das einem *winged helix*-Motiv ähnelt [39] und über das sie an die Konsensussequenz TTTC(C/G)CGC [40] binden (Abb. 1.3B). Die E2F-Transkriptionsfaktoren lassen sich aufgrund ihrer bio-chemischen und funktionellen Eigenschaften in verschiedene Subfamilien einteilen (Abb. 1.3A). E2F1-E2F3b bilden die Familie der Aktivatoren, deren Aktivität für die Induktion von E2F-Zielgenen

benötigt wird [41] . So reicht allein die Überexpression von einem dieser Transkriptionsfaktoren aus, um eine Zelle aus der G₀-Phase in die S-Phase zu bringen [42, 43]

E2F4 und E2F5 hingegen gehören zu der Familie der *Pocket Protein*-abhängigen Repressoren, die in der G₀-Phase an die E2F-Zielgene binden und diese reprimieren [44, 45] .

Zu den *Pocket Proteinen* (engl.: *Pocket* = Tasche) gehören das schon zuvor erwähnte pRB sowie zwei ihm homologe Proteine: p107 und p130. Die *Pocket Proteine* binden an die Transaktivierungsdomäne der jeweiligen E2F-Transkriptionsfaktoren und maskieren diese (s. Abb. 1.3A). Dieser Repressionsmechanismus wird auch als passive Repression bezeichnet. Die letzte Gruppe, bestehend aus E2F6-E2F8, bilden die *Pocket Protein*-unabhängigen Repressoren, welche ihre Repression unabhängig von assoziierten *Pocket Proteinen*, auf zum Teil noch unverstandene Weise, vermitteln.

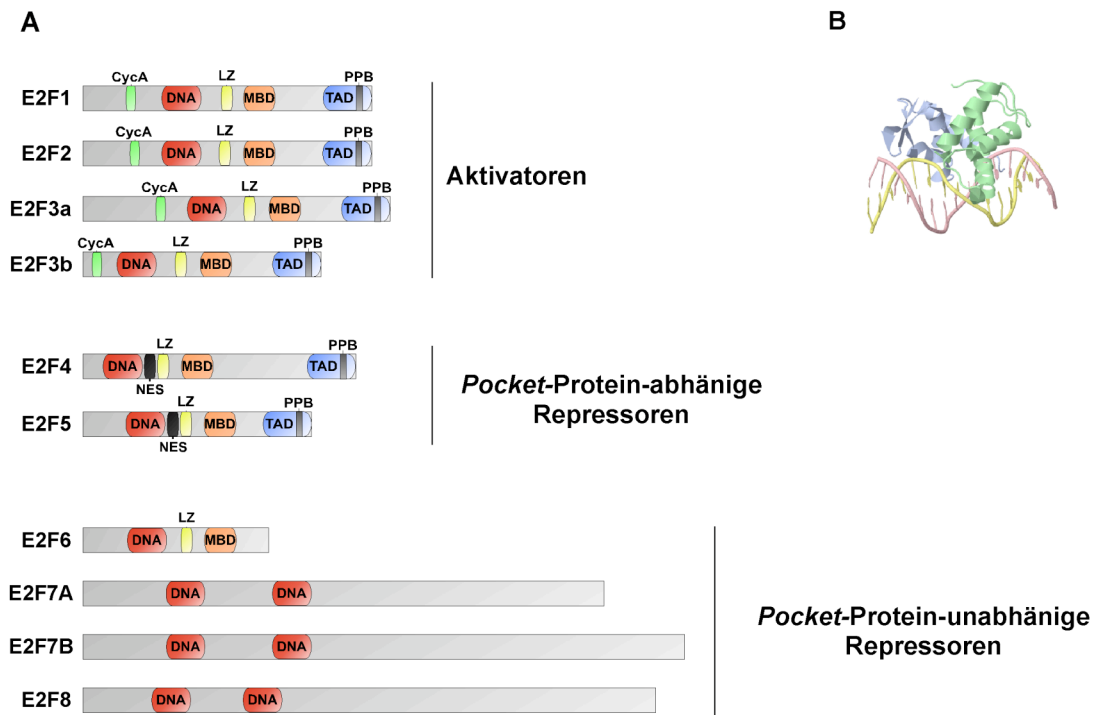


Abb. 1.3: Die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren

A) Schematischer Aufbau der E2F-Transkriptionsfaktoren. CycA = Cyclin A-Bindungs-domäne; DNA = DNA-Bindungsdomäne; LZ = *Leucine Zipper*; MBD = *Marked Box*-Domäne; TAD = Transaktivierungsdomäne; PPB = *Pocket Protein*-bindende Domäne; NES = nukleäres Exportsignal **B)** Kristallstruktur von E2F4 (blau) und DP2 (grün) gebunden an die DNA-Konsensussequenz TTTCGCGCG (Quelle: www.pdb.org).

E2F7 und E2F8, die als einzige Mitglieder der E2F-Familie zwei DNA-Bindungsdomänen besitzen, können untereinander homo- oder heterodimerisieren (E2F7:E2F7, E2F7:E2F8 oder E2F8:E2F8) und binden als solche auch an die DNA [46, 47, 48, 49]. Hingegen binden E2F1-E2F6 als Heterodimere zusammen mit einem ihrer Heterodimerisierungspartner DP-1 oder DP-2 (engl.: *Dimerization Partner*) an die DNA [50, 51]. Die Dimerisierung wird sowohl von der *Leucine Zipper*-Domäne als auch von der E2F-spezifischen *Marked Box*-Domäne vermittelt [52]. Die *Marked Box*-Domäne dient zusätzlich als Interaktionsdomäne für andere Proteine und definiert dadurch zum Teil die unterschiedlichen biologischen Funktionen der E2F-Proteine. So ist E2F1 ein potenter Aktivator von Apoptose in Abwesenheit von Serum. Diese Fähigkeit, die einzigartig für E2F1 ist, hängt von einer Interaktion mit JAB1 ab, welche über die *Marked Box*-Domäne vermittelt wird [53]. Benutzt man ein chimäres E2F1, bei dem die E2F1-spezifische *Marked Box* durch die *Marked Box* von E2F3 ersetzt wurde, verliert E2F1 seine Fähigkeit Apoptose zu induzieren.

Dies wird auch durch Genexpressionsstudien mittels *Microarrays* weiter verdeutlicht. Nach Überexpression von E2F1 oder E2F3 ergeben sich unterschiedliche Gensignaturen für die jeweiligen E2F-Proteine. Überexprimiert man hingegen ein chimäres E2F1-Protein, bei dem die *Marked Box* von E2F1 durch die *Marked Box*-Domäne von E2F3 ersetzt wurde, erhält man die Gensignatur von E2F3 [54]. Gleiches gilt für die Überexpression von chimärem E2F3 mit einer *Marked Box*-Domäne von E2F1, so dass die Herkunft der *Marked Box*-Domäne ganz wesentlich die jeweilige Gensignatur bestimmt. Es wurde postuliert, dass diese Spezifität vermutlich durch zum Teil noch unidentifizierte *Marked Box*-bindende Proteine von E2F3 und E2F1 vermittelt wird.

1.4 Die Familie der *Pocket Proteine*

Das Retinoblastoma-Gen (*RB*) war eines der ersten Tumorsuppressorgene, das kloniert wurde [55] und erhielt seinen Namen daher, dass Patienten mit einer Keimbahnmutation in einem der beiden *RB*-Allele zu fast hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit beidseitige hochaggressive Retinoblastome entwickeln [56, 57]. Zudem ist *RB* sehr häufig in sporadisch auftretenden Tumoren, wie z. B. kleinzelligen Lungenkarzinomen, durch Mutationen inaktiviert [58], so dass seine tumorsuppressiven Eigenschaften nicht auf Retinoblastome beschränkt sind. Wie zuvor erwähnt, existieren p107 und p130 als zwei weitere Paraloge von pRB in Mensch und Maus. Im Gegensatz zu pRB findet man Mutationen in den beiden anderen *Pocket Proteinen* nur sehr selten [58, 59], womit diese wahrscheinlich nicht als Tumorsuppressoren im Menschen fungieren.

Gemein ist allen drei *Pocket Proteinen* allerdings, dass sie über ihre so genannte *Pocket*-Domäne an die Transkriptionsfaktoren E2F1-E2F5 binden. Allerdings binden nicht alle *Pocket Proteine* die verschiedenen E2F-Transkriptionsfaktoren mit gleicher Affinität. So interagiert pRB spezifisch mit E2F1-4, p130 bindet an die repressiven E2F4-5 [60, 61], während p107 nur an E2F4 in der frühen G₁/S-Phase bindet [62]. E2F6 bindet an keines der *Pocket Proteine* [63], sondern interagiert mit Proteinen der Polycomb-Gruppe [64, 65]. Auch für E2F7 und E2F8 konnten keine Interaktionen mit *Pocket Proteinen* nachgewiesen werden [47, 48], so dass diese Faktoren ihre Repression unabhängig von diesen ausüben.

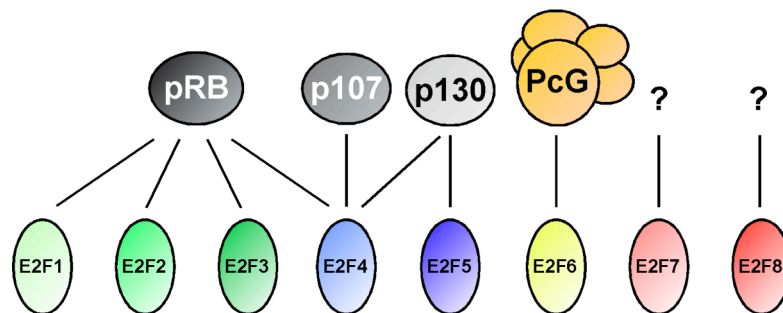


Abb. 1.4: Die Interaktionen der E2F-Transkriptionsfaktoren und Pocket-Proteine

Proteininteraktionen sind durch Striche dargestellt; PcG = Polycomb group

1.5 Knockout-Studien über den pRB/E2F-Signalweg

Um die biologischen Funktionen der verschiedenen E2F-Transkriptionsfaktoren und *Pocket Proteine in vivo* zu untersuchen, wurden inzwischen Knockoutmäuse für alle E2F-Proteine und *Pocket Proteine* hergestellt. Die ersten publizierten Knockoutmäuse des pRB/E2F-Signalwegs waren die *Rb*-defizienten Mäuse [7, 66, 67]. Mäuse ohne funktionelles *Rb* sterben in der Embryonalentwicklung zwischen Tag E13.5 und E15.5. Jedoch ist ein Teil dieses Phänotyps auf einen Plazentadefekt zurückzuführen [68], da die konditionale Inaktivierung von *Rb* ausschließlich im embryonalen Gewebe dazu führt, dass *Rb*-defiziente Tiere geboren werden, die aber kurz nach der Geburt sterben [69].

Die tumorsuppressiven Eigenschaften werden in den lebensfähigen *Rb*^{+/-}-Mäusen sichtbar, da diese mit der Zeit aggressive Schilddrüsen- und Hypophysentumore entwickeln, wobei in den Tumoren immer das Wildtypallel inaktiviert wird [7]. Mäuse hingegen, denen eines der anderen beiden *Pocket Proteine* fehlt, sind lebensfähig und zeigen keine Prädisposition für Tumore, so dass diese beiden *Pocket Proteine* auch in der Maus nicht als klassische Tumorsuppressoren fungieren [70, 71]. Gewinnt man jedoch MEFs von Mäusen, in denen alle drei *Pocket Proteine* inaktiviert wurden, sind diese immortal [72, 73], d. h. sie lassen sich unbegrenzt kultivieren und werden nicht seneszent, so dass die *Pocket Proteine* in der Seneszenzkontrolle miteinander kooperieren und dort zum Teil redundant wirken.

Das Phänomen der Redundanz ist auch bei den E2F-Knockoutmäusen zu beobachten. So sind alle Knockoutmäuse für E2F-Transkriptionsfaktoren, mit der Ausnahme

von $E2f3^{-/-}$ Mäusen, bei Geburt zunächst lebensfähig. $E2f4^{-/-}$ Mäuse zeigen einen Defekt in der Erythropoiese [74] und $E2f5^{-/-}$ Mäuse leiden unter Hydrozephalus [75], werden jedoch entsprechend der erwarteten Frequenz geboren. Bei dem kombinierten Verlust von $E2f4$ und $E2f5$ sterben die Mäuse allerdings kurz nach der Geburt [76], so dass ein E2F in der Abwesenheit des anderen dieses kompensieren kann. Gleiches gilt für den Verlust von $E2f7$ und $E2f8$. Mäuse, die noch je ein Allel von E2F7 ($E2f7^{+/-}E2f8^{-/-}$) oder E2F8 ($E2f7^{-/-}E2f8^{+/-}$) tragen, werden noch nach der erwarteten Frequenz geboren. Der kombinierte Verlust von $E2f7$ und $E2f8$ jedoch, führt zu Letalität in der Embryonalentwicklung um E10.5 [77]. Aus diesem Grund müssen in der Regel alle Mitglieder einer funktionellen Subfamilie deletiert werden, um profunde Effekte beobachten zu können. Die einzige Ausnahme bildet hier der Verlust von E2F3. Dieses ist das einzige Mitglied der E2F-Familie, bei dessen Verlust die Mäuse während der Embryonalentwicklung in einem reinen C57/BL6- oder 129/Sv-Hintergrund sterben [78]. Zudem zeigen $E2f3^{-/-}$ MEFs als einzige einen ausgeprägten Proliferationsdefekt. Nach Verlust von E2F3 ist die Aktivierung vieler E2F-Zielgene nach Seruminduktion stark vermindert, was zu einem verspäteten Wiedereintritt in die S-Phase bei $E2f3^{-/-}$ MEFs führt [78]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Mikroinjektion von Antikörpern in REF52-Zellen. Hier konnte der seruminduzierte S-Phaseeintritt durch E2F3-spezifische, nicht aber durch E2F1- oder E2F2-spezifische, Antikörper inhibiert werden [79]. Die besonders wichtige Rolle von E2F3 für den pRB/E2F-Signalweg wird zudem bei $Rb^{-/-}E2f3^{-/-}$ Mäusen offenbart [80]. $Rb^{-/-}$ Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in manchen Geweben, wie zum Beispiel bei der sich entwickelnden Linse, einen ektopischen Eintritt in die S-Phase. Bei $Rb^{-/-}E2f3^{-/-}$ Mäusen hingegen ist der Prozentsatz an proliferativen Zellen fast genauso hoch wie bei Wildtyp-Mäusen, so dass ein großer Teil der Effekte von $Rb^{-/-}$ Mäusen mit deregulierter E2F3-Aktivität erklärt werden kann. Ähnliches lässt sich bei der Expression von E2F-Zielgenen in $Rb^{-/-}E2f3^{-/-}$ MEFs beobachten: Gene, die in $Rb^{-/-}$ MEFs dereprimiert sind, zeigen in $Rb^{-/-}E2f3^{-/-}$ MEFs eine Expression, die fast wieder genauso stark wie bei Wildtyp-MEFs ist (Caroline Schreiber, unveröffentlichte Daten). Auch in der pRb-abhängigen Tumorigenese spielt E2F3 eine wichtige Rolle, da $Rb^{+/-}E2f3^{-/-}$ Mäuse eine verminderte Manifestation von Hypophysentumoren als $Rb^{+/-}$ Mäuse aufweisen [81]. Somit ist E2F3 das wichtigste Mitglied der E2F-Familie, welches hauptsächlich für die Aktivierung von E2F-Zielgenen verantwortlich ist und auch eine wichtige Rolle in der Tumorigenese nach Rb -Verlust übernimmt [81]. Allerdings können die beiden anderen aktivieren-

den E2F-Transkriptionsfaktoren (E2F1 und E2F2), wenn auch nur teilweise, den Verlust von E2F3 kompensieren, da MEFs in denen alle drei aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet wurden ($E2f1^{-/-}E2f2^{-/-}E2f3^{-/-}$) einen noch schwereren Zellzyklusdefekt als $E2f3^{-/-}$ -MEFs aufweisen [41]. Wie bereits erwähnt weisen jedoch weder $E2f1^{-/-}$ [82, 83] noch $E2f2^{-/-}$ MEFs [84] einen Zellzyklusdefekt auf.

1.6 Der *E2F3*-Genlokus

E2F3 ist das einzige bisher bekannte Mitglied der aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren, dessen Lokus für zwei Isoformen codiert: E2F3a und E2F3b [85, 86]. Sie kommen dadurch zustande, dass für beide Isoformen je ein erstes Exon existiert, welches jeweils von einem separaten Promotor angetrieben wird (s. Abb. 1.5).

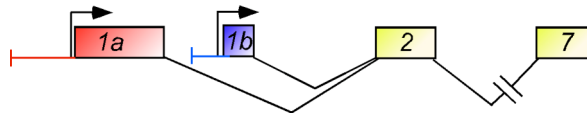


Abb. 1.5: Der *E2F3* Lokus:

Die ersten Exons von *E2F3a* (in rot) und *E2F3b* (in blau) kodieren jeweils für eine unterschiedliche Proteinsequenz und werden von eigenen Promotoren angetrieben (in der entsprechenden Farbe dargestellt). Exon 1a und 1b werden später im Primärtranskript jeweils mit Exon 2 gespleißt, so dass sich *E2F3a* und *E2F3b* nur im ersten Exon unterscheiden.

Hierdurch werden die beiden Isoformen unterschiedlich während des Zellzyklus exprimiert. *E2F3a* ist wie die anderen aktivierenden E2Fs in der S-Phase exprimiert, da es selbst ein E2F-Zielgen ist, während *E2F3b* konstitutiv, also auch in quieszenten Zellen, exprimiert ist [87]. Die beiden Isoformen unterscheiden sich demzufolge nur im N-Terminus, sind aber absolut identisch in dem Großteil des Proteins (s. Abb. 1.3 und Abb. 1.5) und vermutlich übernehmen sie auch *in vivo* die gleichen Aufgaben, was durch isoformspezifische Deletionen von *E2f3a* oder *E2f3b* gezeigt wurde (s. weiter unten). Initial wurde vermutet, dass *E2F3b* als Repressor in quieszenten Zellen fungiert, da es hier sehr stark mit pRB interagiert [85] und somit angenommen wurde, dass es zur Repression von E2F-Zielgenen beiträgt. Dies wurde zunächst auch durch Studien in *E2f3^{-/-}* MEFs (in denen beide Isoformen ausgeschaltet sind) gestützt, da man in quieszenten Zellen eine Induktion von p19^{Arf} (s. Abb. 1.2) beobachten kann [88]. Da in quieszenten Zellen *E2F3a* nicht exprimiert wird, wurde geschlossen, dass *E2F3b* über die Bindung an den p19^{Arf}-Promotor für die Repression dieses Gens verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde jedoch durch neuere Studien widerlegt, in denen isoformspezifische Knockoutmäuse verwendet wurden [89, 90]. Hier konnte weder in *E2f3a^{-/-}* noch in *E2f3b^{-/-}* MEFs eine Induktion von p19^{Arf} beobachtet werden, so dass es sich bei der p19^{Arf}-Induktion in *E2f3^{-/-}* MEFs wahrscheinlich um einen sekundären Effekt handelt, da p19^{Arf} durch verschiedene Formen von Zellstress induziert werden kann [91]. In quieszenten *E2f3b^{-/-}* MEFs ist auch keine Derepression anderer E2F-Zielgene zu beobachten und somit fungiert *E2f3b* nicht als Repressor von E2F-Zielgenen. Mit Hilfe dieser isoformspezifischen Knockoutmäuse konnte zudem gezeigt werden, dass beide Isoformen zu der Aktivierung von E2F-Zielgenen beitragen. Sowohl *E2f3a^{-/-}* MEFs als auch *E2f3b^{-/-}* MEFs weisen eine verminderte Induktion von E2F-Zielgenen und

einen verspäteten S-Phaseeintritt auf [90, 92] . Demzufolge sind E2F3a und E2F3b nötig, um eine ausreichende Induktion von E2F-Zielgenen für den Eintritt in die S-Phase zu gewährleisten.

1.7 E2F-Zielgene

Um die biologischen Funktionen der E2F-Transkriptionsfaktoren weiter zu verstehen, wurden in den letzten Jahren mit Hilfe genomweiter Ansätze eine Vielzahl von neuen Zielgenen identifiziert. Dies wurde zunächst mit Hilfe von Expressionsstudien per *Microarray*-Analyse nach Überexpression von einem der aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren erreicht [93, 94] . Bei diesem Ansatz kann man allerdings keine direkten von indirekten E2F-Zielgenen unterscheiden und zudem ist die Überexpression ein sehr unphysiologisches System. Eine Technik, die diese Probleme umgeht, ist die *ChIP-on-Chip*-Technologie. Nach einer Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wird die immunpräzipitierte DNA für die Hybridisierung auf einem *Microarray* verwendet, wodurch genomische Regionen ermittelt werden können, an die ein Transkriptionsfaktor bindet. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten in den letzten Jahren viele verschiedene E2F-regulierte Gene identifiziert werden [95, 96, 97, 98] . E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren jedoch nicht nur proteinkodierende Gene, da kürzlich die erste E2F3-regulierte miRNA beschrieben wurde [99] . Hierbei handelt es sich interessanterweise um einen negativen Rückkopplungsmechanismus, da diese miRNA wiederum E2F3 herunterreguliert.

Bei den direkten proteinkodierenden E2F-Zielgenen, deren Anzahl sich inzwischen um ca. 1000 bewegt [100] , sind Gene zu finden, die bei den verschiedensten biologischen Prozessen wie Zellzyklus, Mitose, DNA-Reparatur oder auch Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Somit regulieren E2F-Transkriptionsfaktoren nicht nur den Zellzyklus, sondern ein weites Spektrum an biologischen Prozessen.

1.8 E2Fs und Chromatinregulation

Die DNA in Eukaryonten liegt nicht nackt vor, sondern ist um Histone gewickelt. DNA und Histone bilden zusammen das Nukleosom, bei dem ca. 146 Basenpaare von DNA um ein Histonoktamer gewickelt sind. Das Histonoktamer besteht aus je

zwei Histonen H2A, zwei Histonen H2B, zwei Histonen H3 und zwei Histonen H4 [101]. Die Aufwicklung der DNA führt zu einer Kondensation der DNA und hilft unter anderem die ca. 2 Meter lange DNA des menschlichen Genoms in einen Zellkern von nur wenigen Mikrometern zu verpacken. Jedoch ist die Kondensation der DNA nicht die einzige Funktion des Nukleosoms, sondern es dient auch der Regulation von vielen biologischen Kernprozessen wie DNA-Reparatur, Replikation oder Transkription [102]. Ein zentraler Mechanismus wie die Transkription reguliert wird, ist die posttranslationale Modifikation von Histonen. Besonders Histon H3 und Histon H4 haben flexible N-Termini mit vielen Lysinen und Argininen. Durch die positive Ladung der N-Termini binden diese sehr stark an die negativ geladene DNA. Ein Mechanismus, der diese elektrostatische Wechselwirkung aufheben kann, ist die Acetylierung von Lysinen. Durch die Isopeptidbindung zwischen dem Lysin und dem Acetat kommt es zu einer Neutralisierung der positiven Ladung und damit zu einer Auflockerung des Nukleosoms [103]. Zusätzlich dienen bestimmte acetylierte Lysine als Bindungsstelle für andere Faktoren mit einer Bromodomäne. Beispielsweise bindet TAF1 (eine Untereinheit des TFIID-Komplexes) über seine beiden Bromodomänen an doppelt acetyliertes Histon H4 [104] und hilft so bei der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Dementsprechend wirken die so genannten Histonacetyltransferasen (HATs) als Koaktivatoren und die Histondeacetylasen (HDACs) als Korepressoren.

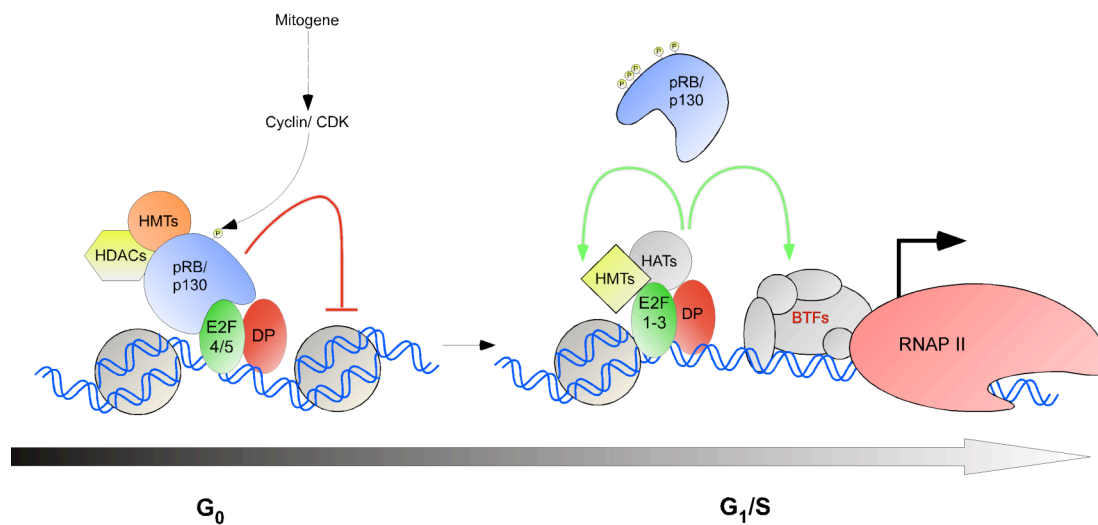


Abb. 1.6: E2F-Proteine rekrutieren chromatinmodifizierende Enzyme zu den Promotoren

In der G₀-Phase des Zellzyklus binden E2F_{4/5} mit den *Pocket Proteinen* p130 und pRB an die Zielgene und rekrutieren repressive Histondeacetylasen (HDACs) und Histonmethyltransferasen (HMTs). Nach mitogener Stimulation werden Cyclin/CDK-Komplexe aktiviert, welche die *Pocket Proteine* durch Phosphorylierung inaktivieren. In der G₁/S-Phase binden daraufhin die aktivierenden E2F₁₋₃ an die Promotoren, welche aktivierende Histonacetyltransferasen (HATs) und Histonmethyltransferasen rekrutieren. Dies führt schließlich zur Bindung von basalen Transkriptionsfaktoren (BTFs) und der RNA-Polymerase II (RNAP II).

Eine weitere posttranslationale Modifikation, die bei der transkriptionellen Kontrolle eine wichtige Rolle spielt, ist die Methylierung von Lysinen, die von den Histonmethyltransferasen (HMTs) ausgeübt wird und von den Lysindemethylasen (KDMs) revertiert werden kann [105]. Da bei der Methylierung von Lysinen keine Änderung der Ladung erfolgt, ist diese weder *per se* aktivierend noch reprimierend. So kann es sein, dass Histonmethylierung sowohl zur Aktivierung als auch zur Repression von Genen beiträgt. Hierbei hängt die aktivierende oder reprimierende Natur von der Position des jeweiligen Lysins ab. So führt die Methylierung (v. a. Di- und Trimethylierung) von Histon H3 an Lysin 9 (H3K9) zu einer Repression der Transkription [106], während eine Trimethylierung von Lysin 4 in Histon H3 (H3K4me3) mit aktiven Genen assoziiert ist [107]. Bei der Lysinmethylierung scheint nicht die Modifikation selbst über Aktivierung oder Repression zu entscheiden, sondern wird von Proteinen und Proteinkomplexen vermittelt, die spezifisch an diese Modifikation binden können und so über die biologische Antwort entscheiden. So wird z. B. methy-

liertes K9 von HP1 (Heterochromatin Protein 1) gebunden, welches zu einer Heterochromatinisierung führen kann. H3K4me3 hingegen, wird von TAF3 (einer Unter-einheit von TFIID) gebunden [108] und hilft so, in analoger Weise zur oben erwähn-ten Acetylierung, bei der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Während des Eintritts in den Zellzyklus müssen in kurzer Zeit solche Gene ange-schaltet werden, die für den Eintritt in den Zellzyklus benötigt werden. Um diese Gene aktivieren zu können, muss allerdings zunächst die aktive Repression aufge-hoben werden. Hierbei dienen die E2F-Transkriptionsfaktoren und die *Pocket Proteine* als zentrale Schalter, die sowohl die Repression in quieszenten Zellen als auch die Aktivierung in serumstimulierten Zellen über Rekrutierung chromatinmodifizie-render Proteine regulieren [109, 110]. Wie zuvor erwähnt, binden die *Pocket Proteine* an die Transaktivierungsdomäne und führen so zu einer passiven Repression durch die Maskierung der Transaktivierungsdomäne. Zusätzlich zu der passiven Repression vermitteln *Pocket Proteine* aber auch eine aktive Repression über die Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Enzymen.

In quieszenten Zellen binden die repressiven E2F-Transkriptionsfaktoren E2F4 und E2F5 an die Promotoren ihrer Zielgene [45] und reprimieren diese (s. Abb. 1.6). Sie erreichen dies über die Rekrutierung von p130 zusammen mit dem assoziierten SIN3B-Komplex, welcher wiederum HDACs beinhaltet [44]. Zudem assoziiert p130 mit den H3K9-spezifischen Methyltransferasen G9a und SUV39H1 [111] und trägt somit weiterhin zur aktiven Repression bei. Auch für pRB wurde eine Assoziation mit SUV39H1 gezeigt [112, 113], jedoch gibt es bis heute keinen Konsens darüber, ob pRB wirklich an die Promotoren von E2F-Zielgenen bindet, da pRB in quieszen-ten Zellen per Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an E2F-Zielgenen kaum nach-weisbar ist [45]. Allerdings kann pRB in seneszenten Zellen an E2F-Zielgenen nachgewiesen werden [114], so dass es sich um keine technische Limitierung, z. B. von geeigneten Antikörpern, handeln kann.

Werden quieszente Zellen durch Mitogene stimuliert, kommt es durch die zuvor be-schriebene Signaltransduktion zur Phosphorylierung der *Pocket Proteine*, zur Auf-hebung der Interaktion mit den E2F-Transkriptionsfaktoren und somit zur Aufhebung sowohl der passiven als auch der aktiven Repression. Da die repressiven E2F4-5 selbst kein nukleäres Lokalisationssignal besitzen, werden diese ohne assoziierte *Pocket Proteine* über ihr nukleäres Exportsignal (s. Abb. 1.3) aus dem Kern ge-schleust [44, 115, 116]. Die Promotoren von E2F-Zielgenen werden im Folgenden

von den aktivierenden E2F1-3 gebunden. Diese rekrutieren ihrerseits Koaktivatoren, welche die Etablierung von aktivierenden Chromatinmodifikationen an den Ziel promotoren katalysieren (s. Abb. 1.6). Für E2F1 konnte eine Assoziation mit dem TIP60-Histonacetyltransferasekomplex nachgewiesen werden [117]. Die Bindung an E2F-Zielgene und die damit assoziierte Histonacetylierung konnte auch per ChIP an verschiedenen E2F-Zielgenen bestätigt werden. Zudem wurde kürzlich eine physikalische Interaktion von E2F3 und E2F1 mit den H3K4-spezifischen Histonmethyltransferasen vom MLL (Mixed Lineage Leukemia)-Typ und vom SET1-Typ nachgewiesen [118]. Die Interaktion wird hier über HCF1 (*Host Cell Factor 1*) vermittelt, da dieses Protein sowohl mit E2F1/3 als auch mit den H3K4-spezifischen Histonmethyltransferasen interagiert. Die siRNA-vermittelte Depletion von HCF1 führt somit zu einem Verlust der Bindung der Histonmethyltransferasen und folglich zu einer stark verminderten Expression von E2F-Zielgenen.

Um die molekulare Funktion von E2F-Transkriptionsfaktoren besser zu verstehen, ist es somit nötig herauszufinden, welche biochemischen Prozesse durch E2F-Transkriptionsfaktoren an ihren Zielgenen vermittelt werden und ob diese Prozesse möglicherweise während der Krebsentstehung dereguliert sind.

1.9 Chromatin Remodelling-Faktoren in der Transkriptionskontrolle

Ein weiterer Mechanismus, der unter anderem bei der Regulation der Transkription eine wichtige Rolle spielt, ist das so genannte *Chromatin Remodelling*. Unter diesem Begriff lassen sich verschiedene biochemische Aktivitäten subsumieren, die von spezialisierten *Chromatin Remodelling*-Faktoren unter ATP-Hydrolyse ausgeführt werden (s. Abb. 1.7). Meistens kommen diese Faktoren als stabile Komplexe mit vielen Untereinheiten bis zu mehreren Megadalton vor [119, 120], bei der eine Helikase die enzymatische Aktivität als ATPase besitzt. Aufgrund von unterschiedlich vorkommenden Domänen in der ATPase unterscheidet man vier verschiedene Familien [121]: die SWI/SNF-Familie, die ISWI-Familie, die CHD-Familie und die INO80-Familie [121].

Diese verschiedenen Familien von ATPasen zeigen unterschiedliche biochemische Aktivitäten bezüglich ihres Substrats, dem Nukleosom. Für den SWI/SNF-Komplex (mit SNF2 als ATPase) konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass dieser *in*

vitro Nukleosomen auf der DNA verschieben kann [122] , dass er Histone vom Chromatin entfernen kann [123] und dass er in der Lage ist die Nukleosomenstruktur derart zu verändern, dass eine veränderte DNAse I-Zugänglichkeit auf dem Nukleosom auch nach Entfernung des SWI/SNF-Komplexes verbleibt [124] .

Der Swr1-Komplex (ein Mitglied der INO80-Familie) hingegen katalysiert die Inkorporation der H2A-Histonvariante H2A.Z [125] . Das Histon H2A.Z ist im Vergleich zu dem kanonischen H2A-Histon sehr instabil, da es schon bei sehr geringen Salzkonzentrationen vom Chromatin eluiert [126] . Diese Destabilisierung trägt somit vermutlich zur Induktion von Genen bei, da man H2A.Z präferenziell an Promotoren von Genen findet, die aktiv sind oder für eine Aktivierung nach geeignetem Stimulus vorbereitet sind [127] .

Trotz sehr vieler *in vitro* Daten über die biochemischen Aktivitäten von *Chromatin Remodelling*-Faktoren bleibt der definitive Mechanismus *in vivo* noch relativ unverstanden. Ein Problem ist unter anderem, dass sehr viele *in vitro* Versuche in Abwesenheit von DNA-bindenden Faktoren, welche normalerweise den *Chromatin Remodelling*-Faktor rekrutieren, durchgeführt wurden, was allerdings nicht der physiologischen Situation *in vivo* entspricht. So katalysiert z. B. der SWI/SNF-Komplex in Abwesenheit vom Gal4-Transkriptionsfaktor eine Verschiebung von allen Nukleosomen auf einem Oligonukleosom. In Anwesenheit von Gal4 jedoch führt die lokale Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes an das Nukleosom um die Gal4-Bindungsstelle zu einem Verlust des Histons an dieser Stelle [128] . Zudem kann der SWI/SNF-Komplex sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Transkription von Zielgenen wirken, je nach dem von welchem Faktor er rekrutiert wird: er wirkt als Aktivator von myeloiden Genen in Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor CEBP/β [129] und als Repressor von bestimmten E2F-Zielgenen in Assoziation mit dem pRB-Protein [130, 131] , so dass der biologische Effekt auch vom Kontext des jeweiligen Promotors abhängt. Auch wenn der definitive Mechanismus von den *Chromatin Remodelling*-Faktoren noch nicht wirklich verstanden ist, so bleibt doch ein vereinfachtes Modell eine gute Erklärungshilfe, bei dem die Energie aus der ATP-Hydrolyse genutzt wird um die Interaktion von Histon und DNA derart zu verändern, dass diese sowohl für Transkriptionsfaktoren als auch für die Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht wird [132] und so die Aktivierung, aber zum Teil auch die Repression, von Zielgenen erleichtert (s. Abb. 1.7).

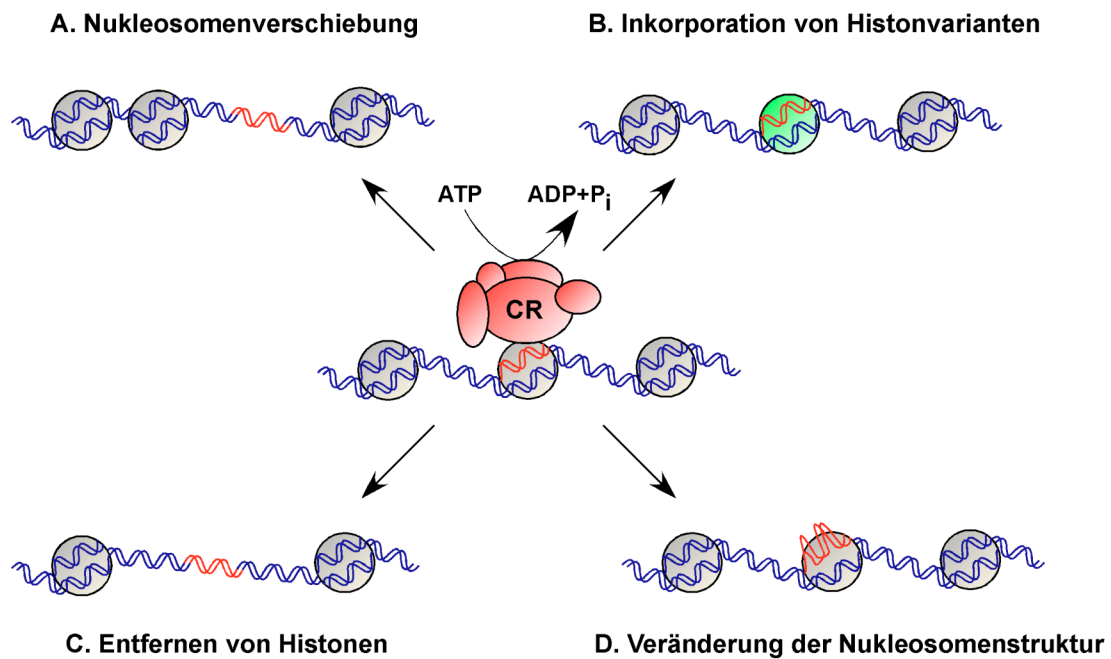


Abb. 1.7: Mögliche biochemische Aktivitäten von *Chromatin Remodelling*-Enzymen

Ein *Chromatin Remodelling*-Faktor (CR) ist in der Lage Nukleosomen auf der DNA zu verschieben (A), die Inkorporation von bestimmten Histonvarianten zu katalysieren (B), Histone aus dem Chromatin zu entfernen (C) oder aber auch die Nukleosomenstruktur dauerhaft zu verändern (D). All diese biochemischen Aktivitäten führen im Endeffekt dazu, dass bestimmte DNA-Regionen (hier rot dargestellt) zugänglich gemacht werden, welche sonst durch das Nukleosom verborgen sind.

1.10 HELLS ist eine SNF2-ähnliche Helikase

Ein weiteres Mitglied der *Chromatin Remodelling*-Faktoren ist die SNF2-ähnliche Helikase HELLS (*Helicase, lymphoid-specific*), welche auch unter dem Namen LSH (*Lymphoid-specific Helicase*) oder PASG (*Proliferation-associated SNF2-like Gene*) bekannt ist. Initial wurde *Hells* aus Thymozyten kloniert [133] und es wurde zunächst per *Northern Blot* gezeigt, dass es auch spezifisch in Thymozyten exprimiert ist. Mit Hilfe der sensitiveren RT-PCR konnte jedoch eine ubiquitäre Expression in verschiedenen Geweben der Maus und in menschlichen Zelllinien nachgewiesen werden [134, 135, 136], so dass HELLS nicht spezifisch in lymphoiden Geweben exprimiert ist. Vielmehr ist es spezifisch in stark proliferierenden Geweben, wie zum Beispiel dem jungen Thymus, erhöht exprimiert [137].

In der Evolution taucht HELLS schon relativ früh auf, da ein entferntes Ortholog namens DDM1 auch in *Arabidopsis thaliana* zu finden ist. Bei all diesen homologen Proteinen befindet sich im N-Terminus eine so genannte *Coiled Coil-Domäne* (s. Abb. 1.8) sowie die weiter C-terminal gelegene SNF2-ähnliche Domäne als katalytische Domäne mit der ATPase-Funktion. Anders als viele andere *Chromatin Remodelling*-Faktoren scheint HELLS nicht in stabilen höhermolekularen Komplexen vorzukommen, da HELLS aus HeLa-Kernextrakten in der Gelfiltration genauso wie rekombinantes HELLS (als Monomer) eluiert [138]. Dies schließt allerdings nicht aus, dass es entweder in unstabilen Komplexen vorkommt, die während der Gelfiltration instabil sind und/oder HELLS nur in substöchiometrischen Mengen in höhermolekularen Komplexen vorkommt. Da HELLS schon als Interaktionspartner von Polycombproteinen [139] und DNA-Methyltransferasen beschrieben wurde [138], ist es deshalb relativ unwahrscheinlich, dass es seine biologische Funktion allein als Monomer erfüllt.

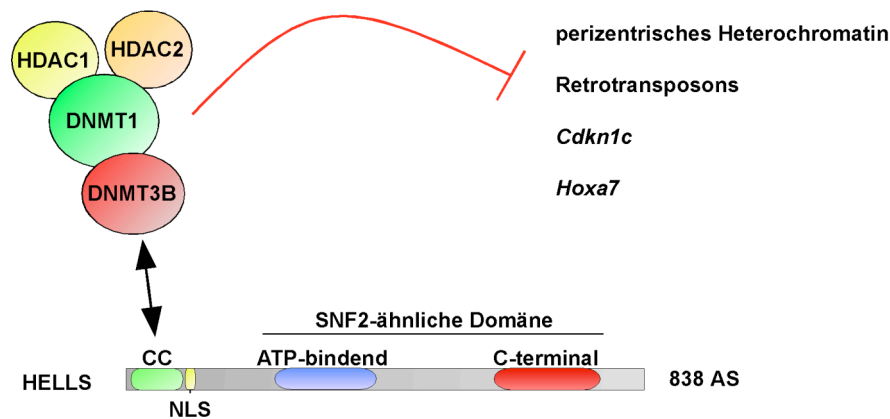


Abb. 1.8: Die SNF2-ähnliche Helikase HELLS

HELLS interagiert über seinen N-Terminus mit einem Komplex aus DNMTs und HDACs, welche zur Repression von heterochromatischen Bereichen und bestimmten Genen beitragen. CC = *Coiled Coil*; NLS = nukleäres Lokalisationssignal

1.11 HELLS reguliert die genomweite DNA-Methylierung

Zwei Labore haben unabhängig voneinander die Knockoutmäuse für *Hells* publiziert [140, 141]. Bei der Studie von Dennis *et al.* handelte es sich um ein Nullallel, bei der die resultierende Knockoutmaus nicht lebensfähig war. Bei der Publikation von Sun *et al.* hingegen handelte es sich vermutlich nur um ein hypomorphes Allel. Bei dieser Maus wurde eine interne Deletion in HELLS hergestellt, so dass Teile der ATP-bindenden Region in der SNF2-ähnlichen Domäne verloren gingen, aber der Rest des Proteins intakt war. Die resultierende Maus war lebensfähig, jedoch war sie sehr viel kleiner als Wildtypmäuse. Zusätzlich zeigte die Maus, und die von ihr gewonnenen MEFs, einen verfrühten Eintritt in die Seneszenz, begleitet von einer Induktion von $p19^{\text{Arf}}$, $p21^{\text{CIP1}}$ und $p16^{\text{INK4A}}$. Jedoch konnte bei beiden Studien ein Effekt auf die genomweite DNA-Methylierung festgestellt werden. Bei beiden Mäusen zeigte sich ein genomweiter Verlust der DNA-Methylierung, der besonders stark an repetitiven Sequenzen ausgeprägt war. Zu diesen repetitiven Sequenzen gehörten vor allen Dingen retrovirale Elemente wie z. B. LINE 1 (*Long interspersed element 1*), aber auch die so genannten *major satellite repeats* des Zentromers. Es wurde postuliert, dass HELLS die *de novo* Methylierung (vermittelt durch DNMT3a/b) reguliert [142], da bei der Transfektion von unmethylierter episomaler DNA diese in *Hells*^{-/-} MEFs nicht mehr wie in den Wildtyp MEFs methyliert wird. Benutzt man hingegen ein zuvor methyliertes Episom, zeigt sich kein Unterschied in der DNA-Methylierung bei Wildtyp und *Hells*^{-/-} MEFs nach mehreren Passagen, so

dass die Erhaltungsmethylierung (vermittelt durch DNMT1) in *Hells*^{-/-} MEFs nicht verändert ist. Vermutlich reguliert HELLS direkt die DNA-Methylierung über eine physikalische Interaktion mit DNA-Methyltransferasen [138, 142]. In beiden Studien wurde eine Interaktion von HELLS mit der DNMT3a/b *de novo*-DNA-Methyltransferase per Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen. In der Publikation von Myant und Stancheva konnte auch DNMT1 mit HELLS kopräzipitiert werden, was in der vorangegangenen Publikation nicht gezeigt werden konnte. Zudem wurde in dieser Studie eine Assoziation von HELLS mit HDAC1 und HDAC2 nachgewiesen, welche über die direkte Assoziation mit DNMT3a/b vermittelt wird (s. Abb. 1.8).

In Übereinstimmung mit diesen Daten und den Daten der Knockoutmäuse wurde dementsprechend nachgewiesen, dass HELLS als Repressor fungieren kann. In einem *Gal4*-Luciferase-Reportersystem führte ein GAL4-HELLS-Fusionsprotein zur transkriptionellen Repression in das Genom integrierten Reporters und zu einer Deacetylierung der Histone um die Gal4-Bindestellen. Allerdings war dieser Effekt unabhängig von der ATPase-Domäne von HELLS: ein trunkiertes GAL4-HELLS-Fusionsprotein, bei dem nur der N-Terminus ohne die SNF2-ähnliche Domäne verwendet wurde, zeigte die gleiche Repression wie HELLS voller Länge. Somit reicht der N-Terminus über dessen Interaktion mit dem DNMT/HDAC-Komplex aus, um Teile der repressiven Eigenschaften von HELLS zu erklären. Dies bietet auch ein attraktives Erklärungsmodell für die unterschiedlichen Phänotypen zwischen den beiden Knockoutmäusen. In der hypomorphen Maus ist noch die Interaktionsdomäne für DNMT3a/b enthalten und somit kann dieses Allel noch Teile der HELLS-Funktion erfüllen, während in der Maus mit einem kompletten Nullallel dies nicht mehr möglich ist.

HELLS reguliert jedoch nicht nur die DNA-Methylierung von repetitiven Sequenzen, sondern auch proteinkodierender Gene. Unter anderem wurden der Zellzyklusinhibitor *Cdkn1c* (codiert für das INK4-Protein p18^{INK4C}) oder das Hox-Gencluster als ein Ziel von HELLS-vermittelter Repression beschrieben [139, 143]. So weisen *Hells*^{-/-} MEFs eine Derepression von bestimmten Hox-Genen (wie z. B. *Hoxa7*) auf [139]. In dieser Studie konnte zudem eine Interaktion zwischen HELLS und Polycombproteinen (den zentralen Regulatoren der Hox-Gene) nachgewiesen werden, was nahe legt, dass HELLS und Polycombproteine bei der Repression von bestimmten Hox-Genen über die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen kooperieren.

Die biochemische Funktion von HELLS ist allerdings noch komplett unverstanden, da sie bis jetzt noch nicht *in vitro* genauer untersucht wurde. Für das HELLS-Ortholog DDM1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde jedoch nachgewiesen, dass es eine *Chromatin Remodelling*-Aktivität besitzt und Nukleosomen auf einem Mononukleosomsubstrat verschieben kann [144] .

Eine offene Frage ist zudem noch, wie HELLS selbst zu seinen genomischen Zielregionen rekrutiert wird, da HELLS selbst keine DNA-Bindungsdomäne besitzt, welche eine sequenzspezifische Rekrutierung zur DNA ermöglichen würde.

1.12 Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit

Wie zuvor erwähnt, ist E2F3 das wichtigste Mitglied der E2F-Familie für die Induktion von Genen, welche für den Austritt aus der Quieszenz und die korrekte Ausführung des Zellzyklus benötigt werden. Absolut offen ist jedoch die Frage, warum dies der Fall ist, da auch die anderen aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der gleichen Gene binden, die nach E2F3-Verlust nicht mehr korrekt aktiviert werden [45, 78] . Eine Hypothese wäre, dass E2F3 spezifisch einen essenziellen Kofaktor (oder auch mehrere) bindet, welcher nicht mit den anderen E2F-Transkriptionsfaktoren interagieren kann. Folglich würde der Verlust von E2F3 zu einer verminderten Rekrutierung des Kofaktors und somit zu einer verminderten Aktivierbarkeit der Zielgene führen.

Wie zuvor erwähnt, ist E2F3 in vielen verschiedenen Tumoren, wie z. B. Prostatakarzinomen [145] , überexprimiert, wobei eine erhöhte E2F3-Expression gleichzeitig eine schlechte Prognose für den Patienten darstellt. Die Identifizierung eines Kofaktors mit einer enzymatischen Aktivität wäre für die Behandlung von E2F3-überexprimierenden Tumoren ein interessantes Ziel für pharmakologische Intervention, da Enzyme in der Regel gut durch kleine Moleküle gehemmt werden können. Um solche potenziellen Ziele für E2F3 zu finden, sollten in dieser Arbeit neue Interaktionspartner von E2F3 identifiziert werden und die Interaktionen durch weitere Proteininteraktionsstudien genauer charakterisiert werden. Um die potenziellen Interaktionspartner zusätzlich funktionell zu charakterisieren, sollte deren Rolle für die E2F-vermittelte Aktivierung von Zielgenen und die Zellproliferation weiter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden zumindest in der Qualitätsstufe „zur Analyse“ von den Firmen Roth, Merck, Riedel-de Haën, AppliChem oder Sigma-Aldrich bezogen.

Alle angegebenen Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfat (10%):

5.0 g Ammoniumpersulfat (Sigma A-3678) ad 50 ml.

Ampicillin Stocklösung (100 mg/ml):

10 g Ampicillin werden in 100 ml ddH₂O gelöst und steril filtriert. Aliquots werden bei –20° C gelagert.

Blotting Puffer für Semidry Blot (1 L)

5,8 g Trizma (Sigma)

2,9 g Glycin

200 ml Methanol

0,01% SDS

ad ddH₂O

ChIP-Blockierungslösung

5 mg/ml BSA in PBS pH 8,0

ChIP-Sonifizierungspuffer:

50 mM Hepes pH 7,9

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na-deoxycholat

0,1% SDS

Proteaseinhibitorcocktail (1:1000)

0,25 mM PMSF

ChIP-Waschpuffer A:

50 mM Hepes pH 7,9

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na-deoxycholat

0,1% SDS

Proteaseinhibitorcocktail (1:1000)

0,25 mM PMSF

ChIP-Waschpuffer B:

20 mM Tris, pH 8,0

1 mM EDTA

250 mM LiCl

0,5% IGEPAL CA-630

0,5% Na-deoxycholat

Proteaseinhibitorcocktail (1:1000)

0,25 mM PMSF

ChIP-Elutionspuffer:

50 mM Tris, pH 8,0

1 mM EDTA

1% SDS

50 mM NaHCO₃

5 X DNA Ladepuffer:

15 % Ficoll

0,05 % Bromphenolblau

0,05% Xylenecyanol

0,05 M EDTA

in 1x TAE

DNA Marker:

MassRuler (Fermentas)

3 x Elektrophoresepuffer (ESB) für SDS-PAGE:

300 mM Tris-Cl pH 6,8

15 mM Na₂EDTA

150 mM DTT

12 % (w/v) SDS

15 % (w/v) Glycerol

30 mg Bromphenolblau

Ethidiumbromid:

Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml und wurde 1:10 000 verwendet

GSH-Elutionspuffer

50 mM Tris pH 8,0

100 mM NaCl

0,1 % Triton X-100

Frisch zugeben: 0,5 mM DTT und 30 mM Glutathion

GST-Sonifizierungspuffer:

50 mM Tris pH 8,0

50 mM NaCl

1 mM DTT 0,25 mM PMSF

Proteaseinhibitorcocktail (Sigma; P8340) 1:1000 (v/v)

HEGN-Puffer

20 mM HEPES-KOH pH 7,8

10 % Glycerol

0,2 mM EDTA

0,1 % IGEPAL CA-630

1 mM beta-Glycerophosphat

10 mM Natrium-Pyrophosphat

10 mM Natriumfluorid

KCl-Konzentrationen zwischen 0-450 mM KCl

Hypotoner Puffer

10 mM HEPES-KOH pH 7,9

10 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

0,1 % IGEPAL CA-630

1 mM DTT

0,25 mM PMSF

Proteaseinhibitorcocktail (Sigma; P8340) 1:1000 (v/v)

Immunfluoreszenz-Blocklösung:

5% BSA (w/v) in PBS

Oligo-Anlagerungspuffer:

50 mM Hepes-HCl pH 7,4

100 mM NaCl

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) :

100 mM in Isopropanol

Polybren (4mg/ml):

Polybren (Fluka) 40 mg in 10 ml ddH₂O gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert

Proteaseinhibitoren :

Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) 1 :1000

Phosphate buffered saline (PBS) (10X Stocklösung) :

137 mM NaCl

3 mM KCl

6,4 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

Der pH-Wert wird mit HCl auf pH 7,4.

RNase A (10 mg/ml):

10 mg/ ml RNase A (Sigma) in:

10 mM Tris pH 7,4

150 mM NaCl

15 min bei 100° C zur DNasen-Inaktivierung behandeln

Sodiumdodecylsulfat 10% (SDS):

10 g SDS in 100 ml

TAE Puffer (50 x):

2 M Trizma (Sigma)

250 mM Essigsäure

50 mM EDTA, pH 8,0

TBS (20 x):

1 M Tris-Cl, pH 7,4

3 M NaCl

TNN Puffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5

120 mM NaCl

5 mM EDTA

0,5% IGEPAL CA-630

10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

2 mM Na_3VO_4

100 mM NaF

Proteaseinhibitorcocktail (Sigma; P8340) 1:1000 (v/v)

Tris-EDTA (TE):

10 mM Tris, pH 7,5

1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Meatbion (Martinsried) oder Biotex (Berlin-Buch) geliefert.

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Anwendung
hBeta-Actin	CAAGGCGGCCAACGCCAAACTCT	GCCATAAAAGGCAACTTTCGGAACG	ChIP
hCCNB1	CGATCGCCCTGGAAACGCATTC	CCAGCAGAAACCAACAGCCGTTTC	ChIP
hCDC6	GTAGCAAAAAAGAGGCGGTG	AGCCCGGCCTCGATTCT	ChIP
hMCM4	CCGAGCGAGGCCTACTTCT	GGACAGTGCCGCTTCTTTCA	ChIP
hp107	GGATGACAACACGTCCCG	CACGGCCCCCGACTTC	ChIP
hp107 +2kb TSS	GATGTTCTGCTTCAGCCTCC	TGGGCAACATAGTCAGATACTATCTCCC	ChIP
hPCNA	TTTCAGTGTGCGATTAGC	CCATTGACCTAAATAACG	ChIP
hU2	TTTGCTCCCACTGCCGTC	CTGAGTCTTTCGGTGCCC	ChIP
mBeta-Actin:	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG	TTTGACATGCCGAGCCGTTGT	ChIP
mBmyb	CTCGTGTCTTGTACGTTTCGCC	CACGTTCCAGGAACTGCAGCT	ChIP
mHells	GCGTCCAAATCTCGTGAGC	GCGAGCTAAATCCTCACACC	ChIP
mHoxA7	CTGGGTCTGGGCTCAATAG	CAGTCCAAAGGCACGTGTCTA	ChIP
mp107	ATCTTCTTATCCCATTCCGGGAGACG	GGGCTCGTCCTCGAACATATCC	ChIP
hCdc6	ACAAATGTCCAAACCGTAACCT	GGTAAATGGGGAGTGTTGCATA	RT-PCR
hHells	TCAAATGAATGCTTCAGGACC	GGACAATCAGTATTTCAAACCC	RT-PCR
hE2F1	GCAGATGGTTATGGTGATCAAAGCCC	ATGATGGTGGTGGTGACACTATGG	RT-PCR
hE2F3b	CTTACAGCAGCAGGCAAAGCG	GGAGCTGAATGAACTTCTTGGTGAGC	RT-PCR
hMcm3	TCGGGCCTTGAAAACATTCGT	GATGCGAGTGAGCAAACCAAT	RT-PCR
hMcm4	ACCTCTATACATGCAACGACTTG	GTCAGGGTAACGGTCAAAGAAG	RT-PCR
hMcm6	TCGGGCCTTGAAAACATTCGT	GATGCGAGTGAGCAAACCAAT	RT-PCR
hp107	ATCTTCTTATCCCATTCCGGGAGACG	GGGCTCGTGCTCGAACATATCC	RT-PCR
hS18	TACTCAACACCAACATCGATGGGC	ATCTTGTAAGTGGCGTGGATTCTGC	RT-PCR
hGAPDH	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	AGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAGG	RT-PCR
mHells fw:	TTCGAAATGTAATGGACAGC	GGGCCACATACAAGAAAAGG	RT-PCR
mMcm3	GAATGAAAAGAGGGCTAACCGC	GCGAACCAGAGAGCATTTAGTAA	RT-PCR
mBeta-Actin	TCTACGAGGGCTATGCTCTCC	GGATGCCACAGGATTCCATAC	RT-PCR
E2f3-com	GTATCTGGGAAACACAAGGAGGTG		<i>E2f3</i> -Genotypisierung
E2f3-neo	GCTCATTCCTCCCACTCATGATC		<i>E2f3</i> -Genotypisierung
E2f3-Wt	GGTACTGATGCCACTCTCGCC		<i>E2f3</i> -Genotypisierung
PGK3'	GAAGAACGAGATCAGCAG		<i>Rb</i> -Genotypisierung
R13wt	CCCATGTTCCGGTCCCTAG		<i>Rb</i> -Genotypisierung

RX3com AATTGCGGCCGCATCTGCATCTTTATCGC

Rb-Geno-
typisierung

Die Spezies ist jeweils mit einem kleinen Buchstaben vor dem jeweiligen Gen gekennzeichnet (h=human; m=murin).

Klonierungsoligonukleotide:

Für E2F3b-Deletionsmutanten

GST-E2F3b fw: CGCGGATCCATGCCCTTACAGCAGCAGG

GST-E2F3b rev: CGCGGATCCTCAACTACACATGAAGTCTTCCA

E2F3b Del1 fw: CGCGGATCCTTGAACAAGGCAGCAGAAGTG

E2F3b Del1 rev: entspricht GST-E2F3b rev

E2F3b Del2 fw: CGCGGATCCCTGTCTGAGGATGGGGGC

E2F3b Del2 rev: entspricht GST-E2F3b rev

E2F3b Del 3 fw: CGCGGATCCCATTTGGCAAGTACCCAAGG

E2F3b Del 3 rev: entspricht GST-E2F3b rev

E2F3b Del 4 fw: entspricht GST-E2F3b fw

E2F3b Del 4 rev: CGCGGATCCTCACATAGA AAC TGA GCA ATC GCT AT

E2F3b Del 5 fw: entspricht E2F3b Del2 fw

E2F3b Del 5 rev: entspricht E2F3b Del 4 rev

Die eingefügte BamH I-Schnittstelle, welche zur Klonierung verwendet wurde, ist unterstrichen.

Für HELLS-Deletionsmutanten

HELLS Del1 fwCCGCTCGAGATGCCAGCGGAACGGC

HELLS Del1 revCCGCTCGAGGTACCATCGCATCACTCCTCC

HELLS Del2 fwCCGCTCGAGCAAGTAGAAGGCATGGAATGGC

HELLS Del2 revCCGCTCGAGCTAAATTCTTGTGTAACAGGGTCT

HELLS Del3 fwCCGCTCGAGATCGATGAAGAATTGGTAACAAAT

HELLS Del3 revCCGCTCGAGAAACAAACATTCAGGACTGGAATC

Die eingefügte Xho I-Schnittstelle, welche zur Klonierung im pGEX6-P1 Vektor verwendet wurde, ist unterstrichen.

Für RNAi

Lenti hHells 1 fw:

TGAAGGTCATTAGTGATAAATTCAAGAGATTTATCACTAATGACCTTCTTTTTTC

Lenti hHells 1 rev:

TCGAGAAAAAAGAAGGTCATTAGTGATAAATCTCTTGAATTTATCACTAATGACCTTCA

Lenti hHells 2 fw:

TCTATTGCATTGATGATTCATTCAAGAGATGAATCATCAATGCAATAGTTTTTTC

Lenti hHells 2 rev:

TCGAGAAAAAATCTATTGCATTGATGATTCATCTCTTGAATGAATCATCAATGCAATAGA

Zur Klonierung wurden die komplementären Oligonukleotide angelagert und in den Hpa I/Xho I geschnittenen pSicoR Vektor kloniert.

Retro mHells 1 fw:

GATCCCCTGACGAAGATCTAGAATTATTCAAGAGATAATTCTAGATCTTCGTCATTTTTTA

Retro mHells 1 rev:

AGCTTAAAAATGACGAAGATCTAGAATTATCTCTTGAATAATTCTAGATCTTCGTCAGGG

Retro mHells 3 fw:

GATCCCCTCAGTTCCCTAGTGAATTATTCAAGAGATAATTCAGTAGGGAACTGATTTTTTA

Retro mHells 3 rev:

AGCTTAAAAATCAGTTCCCTAGTGAATTATCTCTTGAATAATTCAGTAGGGAACTGAGGG

Retro Luci fw:

GATCCCCCATCACGTACGCGGAATACTTTCAAGAGAAGTATTCCGCGTACGTGATGTTT
TTA

Retro Luci rev:

AGCTTAAAAACATCACGTACGCGGAATACTTAGTTCTCAAGTATTCCGCGTACGTGATG
GGG

Zur Klonierung wurden die komplementären Oligonukleotide angelagert und in den Bgl II/Hind III verdauten pSuperior Vektor kloniert. Zur Generierung retroviraler shRNA Vektoren

wurde die shRNA-Sequenz über EcoR I/Xho I mit der H1-Promoterkassette herausgeschnitten und über diese Restriktionsschnittstellen in den pMSCV.Blast Vektor kloniert.

2.1.4 Plasmide

Erhaltene oder gekaufte Plasmide

Name	Verwendung
pBABE-HA-ER-E2F3a	retroviraler Vektor für das HA-ER-E2F3a Fusionsprotein (Kristian Helin)
pCDNA3	leerer eukaryotischer Expressionsvektor
pCND3-HA-E2F1	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F1
pCND3-HA-E2F3a	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F3a
pCND3-HA-E2F3b	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F3b
pCND3-HA-E2F4	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F4
pGEX-6-P1	bakterielle Expression von GST-Fusionproteinen (wurde für GST-Konstrukte verwendet)
pMSCV	retroviraler Vektor
pLP1	Verpackungsplasmid für lentivirale Konstrukte (Invitrogen)
pLP2	Verpackungsplasmid für lentivirale Konstrukte (Invitrogen)
VSVG	Plasmid, das für die VSVG Hülle der Lentiviren kodiert

Name	Verwendung
pBABE-HA-ER-E2F3a	retroviraler Vektor für das HA-ER-E2F3a Fusionsprotein (Kristian Helin)
pCDNA3	leerer eukaryotischer Expressionsvektor
pCND3-HA-E2F1	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F1
pCND3-HA-E2F3a	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F3a
pCND3-HA-E2F3b	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F3b
pCND3-HA-E2F4	eukaryotischer Expressionsvektor für HA-markiertes humanes E2F4
pGEX-6-P1	bakterielle Expression von GST-Fusionproteinen (wurde für GST-Konstrukte verwendet)
pMSCV	retroviraler Vektor
pLP1	Verpackungsplasmid für lentivirale Konstrukte (Invitrogen)
pLP2	Verpackungsplasmid für lentivirale Konstrukte (Invitrogen)
VSVG	Plasmid, das für die VSVG Hülle der Lentiviren kodiert

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Verwendung
pGEX-E2F3b	bakterielle Expression von E2F3b
pGEX-E2F3b Del1	bakterielle Expression einer E2F3b Deletionsmutante
pGEX-E2F3b Del2	bakterielle Expression einer E2F3b Deletionsmutante
pGEX-E2F3b Del3	bakterielle Expression einer E2F3b Deletionsmutante
pGEX-E2F3b Del4	bakterielle Expression einer E2F3b Deletionsmutante
pGEX-E2F3b Del5	bakterielle Expression einer E2F3b Deletionsmutante
pGEX-HELLS-Del1	bakterielle Expression einer HELLS Deletionsmutante
pGEX-HELLS-Del2	bakterielle Expression einer HELLS Deletionsmutante
pGEX-HELLS-Del3	bakterielle Expression einer HELLS Deletionsmutante
pSicoR Ktrl.	lentivirales shRNA Plasmid mit Kontroll-shRNA
pSicoR shHells 1	lentivirales shRNA Plasmid gegen humanes Hells
pSicoR shHells 2	lentivirales shRNA Plasmid gegen humanes Hells
pMSCV shLuci	retrovirales shRNA Plasmid gegen Luciferase
pMSCV shHells 1	retrovirales shRNA Plasmid gegen murines Hells
pMSCV shHells 3	retrovirales shRNA Plasmid gegen murines Hells

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Katalog-Nr.	Firma/Quelle	Konzentration	Anwendung
BrdU	Ratte	BZL20631	Biozol	1:150	IF
Cdc6	Maus	ab-3	Oncogene	1:1000	Western
E2F1	Kaninchen	sc-193	Santa Cruz	1:1000 ; 2 µg	Western; ChIP
E2F3	Kaninchen	sc-878	Santa Cruz	1:1000 ; 2 µg	Western; ChIP
E2F4	Kaninchen	sc-1082	Santa Cruz	1:1000 ; 2 µg	Western; ChIP
E2F3	Maus		Hybridoma	1:4	Western
E2F3	Kaninchen AK gegen humanes E2F3b voller Länge		Kaninchenserum	5 µl	IP
HA	Maus	MMS-101R	Covance	1:2000;2µg; 1:200	Western; ChIP; IF
HELLS	Kaninchen	sc-28202	Santa Cruz	1:1000; 4 µg	Western; ChIP
HELLS	Kaninchen		Kathrin Mügge	5 µg	ChIP (MEFs)
HELLS	Kaninchen	NB100-278	Novus	4 µg	ChIP
HELLS	Kaninchen	ab3851	Abcam	0,180555556	IF
Alpha-Tubulin	Maus	T8203	Sigma	1:10.000	Western
IgG	Kaninchen	I5006	SIGMA		ChIP
p107	Kaninchen	sc-318	Santa Cruz	1:1000	Western
p130	Maus		Santa Cruz	1:1000	Western
pRb	Maus	9309	Cell Signaling	1:1000	Western
pRB (pSer780)	Kaninchen	9307	Cell Signaling	1:1000	Western

Sekundärantikörper

Antikörper	Katalog-Nr.	Firma/Quelle	Konzentration	Anwendung
a-Kaninchen-IgG/HRP	P0448	DAKO	1:5000	Western
a-Maus-IgG/HRP	P0447	DAKO	1:5000	Western
Protein-A/HRP	610438	BD Biosciences	1:5000	Western
a-Ratte-IgG Cy2	712-225-150	Jackson	1:400	IF
a-Kaninchen-IgG Alexa647	A31573	Molecular Probes	1:400	IF
a-Maus-IgG Cy3	712-225-151	Jackson	1:400	IF

2.1.6 Generelle Laborgeräte

Avanti Centrifuge J-25 (Beckman)

Branson Sonifier 450 (Sonifiziergerät)

Deconvolution-Mikroskop DMI 6100 B (Leica)

Eppendorf Centrifuge 5417R (Zentrifuge)

Hyperfilm ECL (GE Life Sciences)

iCycler Real-time PCR (Biorad)

Protein-Gelelektrophoresekammern Protean II (Biorad)

PVDF Membran 0,45 µm (Millipore)

Semidry-Blotvorrichtung Transblot (Biorad)

Whatman Papier (Schleicher&Schuell)

X-Omat AR Film (Kodak)

2.2 Zellbiologische Methoden

Kultivierung eukaryotischer Zellen

Materialien:

- Zellkulturschalen (Falcon) 15 cm, 10 cm und 6 cm Durchmesser
- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) mit 4,5 g/l Glukose(Gibco)
- fötales Kälberserum (Gibco)
- Penicillin/ Streptomycin (10 000 U/ml // 10 000 µg/ml; Gibco)

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HCT116	Humanes Kolonkarzinom
PlatE	Verpackungszelllinie zur Produktion ekotropher Viren
Saos-2	Humanes Osteosarkom
T98G	Humanes Glioblastom
293TN	Humane embryonale Nierenzelllinie
NIH3T3	Immortalisierte Mausfibroblasten
Mausembryofibroblasten (MEFs)	Primäre Fibroblasten aus murinen Embryonen (E13,5) gewonnen

Die Zellen wurden in dem Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep bei 37°C, 5% CO₂ und 100% relativer Feuchte im Inkubator gehalten.

Passagieren von Zellen

Materialien:

- Trypsin (500mg/l) /EDTA (200mg/l) (Gibco)
- PBS

Je nach Zellart wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der Zellkulturschale gelöst. Hierzu wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin (für ein 10 cm Schale) bei 37°C inkubiert, mit frischem Medium versetzt und neu ausplattiert.

Einfrieren von Zellen

Materialien:

- Einfriermedium: 90% FCS + 10% DMSO (Sigma)
- 15 ml Falcon-Röhrchen
- 2 ml Einfrierröhrchen (Nunc)

Die Zellen wurden trypsiniert, mit dem jeweiligen Medium auf 10 ml aufgefüllt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden sie 5 min bei 1000 rpm in einer Zentrifuge bei Raumtemperatur pelletiert. Der Medienüberstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in 2 ml Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend 5 min auf Eis gelagert und dann auf -80° C heruntergekühlt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen nach einigen Tagen in den Flüssigstickstoff-Tank überführt.

Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in ein mit 10 ml Medium gefülltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, wurden die Zellen 5 Minuten bei 1000 rpm bei Raumtemperatur in einer Heraeus Zentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Zellkulturschale überführt.

Herstellung von Mausembryofibroblasten (MEFs)

Materialien

- FCS (Gibco)
- DMSO (Sigma)

Mausembryonale Fibroblasten wurden aus Embryonen (mit einem Alter von E13.5) isoliert. Die Embryonen wurden aus dem Uterus der Mutter entnommen, der Kopf abgetrennt und Viszera komplett entfernt. Der Rest wurde in kleine Stücke zerschnitten, in PBS gewaschen und über Nacht mit 0.05% Trypsin/EDTA auf Eis inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das überschüssige Trypsin abgenommen und die Gewebestückchen für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Resuspendieren in 5 ml Medium wurde die Zellsuspension auf eine 175mm² Zellkulturflasche ausplattiert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und anschließend wie oben beschrieben, eingefroren.

Synchronisation von Zellen durch Serumentzug

Materialien:

- Medium ohne FCS oder 20% FCS

Die Zellen wurden so ausplattiert, dass sie am folgenden Tag eine Dichte von ca. 70% aufwiesen. Am Tag des Serumentzugs wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Medium ohne FCS versehen. Je nach Zelltyp wurden die Zellen für 48-72 h unter serumfreien Bedingungen gehalten. Zur Induktion wurden die Zellen mit Medium und 20% FCS inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Seruminduktion geerntet.

Produktion ekotropher Viren durch PlatE-Zellen

Materialien:

- PlatE Verpackungszellen
- Sterilfilter (Ø 0,45 µm)

Zur Produktion ekotropher Viren wurde die PlatE-Verpackungszelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die stabil Gene für virale Hüllproteine exprimiert. Durch Transfektion von geeigneten Plasmiden können somit Retroviren produziert werden, die Zellen mit dem ekotrophen Rezeptor infizieren können. Hierzu wurden 5×10^6 PlatE-Zellen einen Tag vor der Transfektion ausplattiert und am nächsten Tag nach der CaPO_4 -Methode (s. 2.7.11) mit 30 µg DNA transfiziert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 6 ml neuen Medium versehen. Ab jetzt erfolgten weitere Inkubationen der Zellen bei 32°C. Am nächsten Morgen wurde der Überstand geerntet und 4 ml auf die PlatE-Zellen gegeben. Dieser Überstand wurde dann nach neun weiteren Stunden geerntet und mit dem ersten Überstand vereinigt. Der Virusüberstand wurde anschließend durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und entweder zur Infektion verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Infektion von Zellen mit ekotrophen Viren

Materialien:

- Virusüberstand
- Polybren 4 mg/ ml (Sigma)
- Sterilfilter (Ø 0,45 µm)

Tag 1: Splitten der zu infizierenden Zellen

Pro 10 cm-Schale wurden ca. 1×10^6 Zellen ausplattiert.

Tag 2: Infektion mit dem Virusüberstand

Hierzu wurde der virale Überstand 1:1 mit Medium verdünnt und anschließend Polybren in einer Verdünnung von 1:500 hinzugegeben. Die Zielzellen wurden durch drei Infektionsrunden mit dem Virus infiziert. Die Infektion der Zellen erfolgte bei 32°C. Die Zellen wurden am Morgen mit 4 ml Virusüberstand versehen. Am Abend wurde dieser entfernt und 6 ml frischer Virusüberstand auf die Zellen gegeben.

Tag 3: Dritte Infektion und Mediumwechsel

Am Morgen wurde der Virusüberstand wieder abgesaugt und mit 4 ml frischem Virusüberstand versehen. Am Abend wurde der Virusüberstand durch 10 ml frisches Medium ersetzt.

Tag 5: Splitten der Zellen und Selektion

In der Regel wurden die Zellen 1:2 gesplittet und uninfectierte Zellen durch Selektion mit Puromycin oder Blasticidin für zwei bis drei Tage abgetötet.

Produktion von Lentiviren

Materialien:

- Verpackungsplasmide: pLP1, pLP2, VSVG
- 293TN Zellen
- Sterilfilter (Ø 0,45 µm)

Am Tag vor der Transfektion wurden 6×10^6 293TN Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Diese wurden am nächsten Tag durch die CaPO_4 -Methode transfiziert (6 µg pLP1, 3 µg pLP2, 3 µg VSVG, 12 µg Expressionsplasmid) und mit 25 µM Chloroquin versetzt. Das Medium wurde am nächsten Tag abgenommen und mit 6 ml frischem Medium versetzt. Dieses wurde einen Tag später abgenommen und bei 4°C gelagert und die Zellen wieder mit 6 ml frischem Medium versetzt, welches wiederum am nächsten Tag abgenommen wurde. Die beiden Überstände wurden vereinigt, durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und bei -80°C gelagert.

Infektion von Zellen mit Lentiviren

Materialien:

- Lentiviraler Überstand
- Polybren (4 mg/ml)

Pro 10 cm-Zellkulturschale wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden diese mit 3 ml lentiviralem Überstand, 3 ml frischem Medium und 9 µl Polybren versehen. Das Medium wurde ca. 24 h danach gewechselt.

Immunfluoreszenz

Materialien:

- Fixierungslösung (4% PFA (w/v)/ 2% Sucrose (w/v)) in PBS
- Immunfluoreszenz-Blocklösung
- ImmuMount (Vectashield)

Am Tag vor der Prozessierung für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Glasplättchen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min

mit Fixierungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 0,2-0,5 % Triton X-100 (v/v) in PBS für 10 min permeabilisiert und wie zuvor gewaschen. Anschließend wurde für mindestens 30 min mit Immunfluoreszenz-Blocklösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in Immunfluoreszenz-Blocklösung verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C ü. N.. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (auch in Immunfluoreszenz-Blocklösung verdünnt) für eine Stunde bei RT. Die Deckgläschen wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Minute in DAPI-Lösung (1:5000 in PBS verdünnt) gegengefärbt. Daraufhin wurden die Zellen mit Hilfe von ImmuMount eingedeckelt.

BrdU-Assay

Materialien:

- s. Immunfluoreszenz-Protokoll
- anti-BrdU Antikörper (Biozol)
- DNase I (Roche)

Das Thymidinanalogon BrdU wird von Zellen in ihre DNA inkorporiert, die sich gerade in der S-Phase befinden. Somit können später mit Hilfe eines Antikörpers gegen BrdU Zellen per Immunfluoreszenz identifiziert werden, welche sich zu der Zeit der Inkubation mit BrdU in der S-Phase befanden. Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausplattiert. Für den BrdU-Puls wurden die Zellen für zwei Stunden mit 50 µM BrdU inkubiert und anschließend für die Immunfluoreszenz prozessiert. Das Protokoll ist identisch mit dem Protokoll der Immunfluoreszenz mit der Ausnahme der Inkubation des Primärantikörpers. Der anti-BrdU Antikörper wurde 1:150 in folgender Lösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert: 3 mM MgCl₂, 100 U/ml DNase I in Immunfluoreszenz-Blocklösung. Ab hier erfolgte das Protokoll wieder wie bei der normalen Immunfluoreszenz. Als Sekundärantikörper diente ein Cy3-gekoppelter anti-Ratte Antikörper.

Kolonienformationsexperiment

Materialien:

- Färbelösung: 0,05% (w/v) Kristallviolett (Merck) in PBS
- Formaldehyd 37%

Pro 10 cm-Schale wurden 1×10^5 Zellen ausplattiert und für 7-8 Tage weiter kultiviert. Die Zellen wurden für eine halbe Stunde mit 3,7% Formaldehyd (zugegeben zu dem Wachstumsmedium der Zellen) bei RT fixiert, anschließend wurde die Fixierungslösung verworfen und die Zellkulturschalen mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für

15 min mit der Färbelösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit H₂O wurden die Schalen getrocknet und fotografiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Anlagern von Oligonukleotiden

Materialien:

- Oligo-Anlagerungspuffer
- Oligonukleotide (Konz.: 2 µg/µl)

Je 1 µl der Oligonukleotide werden mit 48 µl Oligo-Anlagerungspuffer versetzt. In einer PCR-Maschine wurden die Oligonukleotide für 4 min bei 90° C denaturiert, dann für 10 min auf 70° C gehalten und dann langsam (0,01°/C pro sec) auf 10° C heruntergekühlt. Für eine Ligation in einen Vektor wurden 2 µl in einem 20 µl-Ligationsansatz verwendet.

PCR zur Klonierung eines DNA-Fragmentes

Zur PCR wurde das Accuprime Pfx Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Quantitative PCR (qPCR)

Materialien:

- qPCR Kit für SybrGreen (Thermo Scientific)

Die quantitative PCR (qPCR) wurde mit Hilfe des angegebenen Kits nach den Angaben des Herstellers verwendet:

0,5 µl Matrizen-DNA (ChIP-DNA oder cDNA)

10 µl SybrGreen 2x Mix

5 pmol 5'-Primer

5 pmol 3'-Primer

mit ddH₂O auf 20 µl auffüllen

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

95°C 15 min

94°C 20 sec I

58°C 45 sec I => 40 Zyklen

72°C 45 sec I

Bei den qChIPs wurde das Ergebnis als Prozent des Inputs (es wurden immer 1% Input als Referenz verwendet) mit Hilfe der CT-Werte durch folgende Formel berechnet:

$$\% \text{ des Inputs} = 2^{\text{CT}(1\% \text{ Input}) - \text{CT}(\text{IP})} \times 1\%$$

Für quantitative RT-PCRs (qRT-PCRs) wurde folgende Formel zur Berechnung der x-fachen Induktion (fold induction) im Vergleich zur Kontrolle (kontrollinfizierte Zellen) berechnet. Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene *S18* oder *GAPDH* als Referenz verwendet:

$$\text{CT}^{\text{Gen}} - \text{CT}^{\text{Haushaltsgen}} = \Delta \text{CT}$$

$$\Delta \text{CT}^{\text{Probe}} - \Delta \text{CT}^{\text{Kontrolle}} = \Delta \Delta \text{CT}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta \Delta \text{CT}}$$

Die Messungen für qChIPs und qRT-PCRs wurden in Triplikaten durchgeführt. Für die Werte wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung (MW \pm SD) folgendermaßen berechnet:

$$\text{Standardabweichung (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2 %-igen Agarosegelen in einem TAE-Puffer nach Standardmethoden.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit Hilfe eines Gelextraktionskits der Firma Genomed nach den Angaben des Herstellers.

Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA erfolgte im Wesentlichen wie in Ausubel (1987) beschrieben, mit Puffern und Enzymen der Firma New England Biolabs.

Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte im Wesentlichen wie nach Ausubel (1987) mit Puffern und Enzymen der Firma USB.

Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien (Minipräp)

Die analytische Präparation von DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll mit alkalischer Lyse.

Präparative Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxipräp)

Die präparative Isolation von Plasmid DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines Maxi-Kits der Firma Genomed.

Calciumphosphat-Transfektion

Materialien:

- 2x HBS
- CaCl_2 2,5 M
- ddH₂O

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70% aufwiesen. 1-2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Zur Transfektion einer 10 cm-Schale wurde folgender Ansatz verwendet:

30 µg DNA

50 µl 2,5 M CaCl_2

mit ddH₂O auf 500 µl auffüllen

Dieser Ansatz wird tropfenweise zu 500 µl 2x HBS pipettiert, das auf einem Vortexer geschüttelt wurde. Die Lösung mit DNA-Präzipitat wurde auf die Zellen gegeben, am nächsten Tag wurden diese mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

RNA Isolation

Materialien:

- Trizol (Invitrogen)
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% Ethanol mit DEPC-ddH₂O hergestellt
- DEPC-ddH₂O

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml Trizol abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Daraufhin wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben und für 5 sec gevortext. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 14 000 x g zentrifugiert und die wässrige

Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 500 µl Isopropanol hinzupipettiert, wieder kurz gevortext und bei 12 000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 500 µl 75%-igem Ethanol (DEPC) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Ethanol wurde abgesaugt, das Pellet kurz luftgetrocknet und in 30 µl DEPC-ddH₂O gelöst. Die RNA wurde anschließend zur cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

cDNA Synthese

1-2 µg RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen) in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben und anschließend für eine qPCR verwendet.

2.4 Biochemische Methoden

Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Materialien

- Bakterienstamm BL21(DE3)
- GSH-Sonifizierungspuffer
- Stabsonifizierer (Branson 450 Sonifier)
- 1M IPTG
- GSH-Sepharose CL-4B (GE Healthcare)
- Triton X-100
- LB-Medium; LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB^{Amp})
- PBS
- GST-Proteinlagerungspuffer
- GSH-Elutionspuffer

Eine Bakterienkolonie oder ein Stück eines Glycerolstocks wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 10-20 ml LB^{Amp} überführt und ü. N. bei 37°C in einem Wärmeschüttler wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:20 in LB-Medium verdünnt und wieder wie oben kultiviert bis eine OD₆₀₀≈0,7 erreicht wurde. Ein Aliquot von 1 ml wurde für spätere SDS-PAGE Analysen abgenommen und der Rest der Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Zur Aufreinigung wurden 100-1000 ml Bakterienkultur verwendet, was eine Ausbeute von 0,2-2 mg rekombinantem Protein ergab. Die Bakterien wurden für 3 h bei 37°C oder ü. N. bei 18°C inkubiert und nach dieser Zeit wurde wieder ein 1 ml Aliquot abgenommen. Ab jetzt wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C oder auf Eis, wenn nicht anders beschrieben, durchgeführt. Die Bakterien wurden für 15 min bei 8 000 x g pelletiert, der Überstand verworfen

und das Bakterienpellet in GSH-Sonifizierungspuffer (1/40 des Ausgangsvolumens der Bakterienkultur) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch sechs Sonifizierungsimpulse bei 50 W und einer Dauer von je 15 sec aufgeschlossen. Zwischen den Pulsen wurde die Suspension für 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Falconröhrchen überführt. Die GSH-Sepharose wurde in PBS äquilibriert und ein 1/1-Verhältnis von PBS/Sepharose zu dem Bakterienlysate gegeben. Pro ml Lysat wurden 500 µl PBS/Sepharose hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf dem Drehrad bei RT. Anschließend wurde die Sepharose für 2 min bei 2000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Es wurde PBS hinzugegeben (10-faches Volumen der Sepharose) kurz invertiert und wie zuvor zentrifugiert. Insgesamt wurde die Sepharose viermal mit PBS gewaschen. Für die Verwendung bei GST-Pulldowns wurde die Sepharose in GST-Proteinlagerungspuffer resuspendiert (1 Vol Puffer auf 1 Vol Sepharose) und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Herstellung eines Antikörpers gegen GST-E2F3b

GST-E2F3b wurde wie oben beschrieben aus *E. coli* aufgereinigt. Um das rekombinante Protein zur Immunisierung von Kaninchen zu verwenden, wurde es von der Sepharose eluiert. Hierfür wurde die Sepharose in GSH-Elutionspuffer (1 Vol Puffer auf 1 Vol Sepharose) resuspendiert und für 15 min bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 2 min wurde der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt und neuer Elutionspuffer auf die Sepharose gegeben. Insgesamt wurde viermal eluiert und die Eluate vereinigt. Für die Immunisierung eines Kaninchens wurden 2 mg rekombinantes Protein von der Firma Davids Biotechnologie verwendet.

Herstellung von Gesamtzellextrakten

Materialien:

- TNN-Puffer
- eiskaltes PBS

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgekratzt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 x g pelletiert und in TNN resuspendiert. Das Volumen des TNN-Puffers wurde so bemessen, dass es dem Volumen des Zellpellets entsprach. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis lysiert und anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration des Lysats per Bradford-Assay (Biorad) bestimmt.

Herstellung von Kernextrakten

Materialien:

- eiskaltes PBS
- Hypotoner Lysepuffer
- Dounce Homogenisierer
- HEGN-Puffer (mit 0,1 % Igepal CA-630 (v/v) oder 1% Igepal CA-630 (v/v)) und unterschiedlichen KCl-Konzentrationen

Für GST-*Pulldowns* wurde ein HEGN-Puffer mit 0,1 % (v/v) Igepal CA-630 und für Immunpräzipitationen mit 1 % (v/v) Igepal CA-630 verwendet.

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in PBS (mit 0,5 mM PMSF) abgekratzt. Anschließend wurden diese bei 1000 x g für 10 min pelletiert und die Zellen in hypotonem Lysepuffer (dem fünffachen Volumen des gepackten Zellvolumens) resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellmembranen durch zwölf Stöße mit einem Dounce Homogenisierer aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellkerne durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 800 x g pelletiert und der Überstand (Cytoplasma) verworfen. Die Zellkerne wurden in HEGN-Puffer mit 450 mM KCl resuspendiert (Volumen entsprechend dem einfachen Zellkernvolumen) und für 30 min auf Eis geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei 20 000 x g für 60 min abzentrifugiert. Der Überstand (Kernextrakt) wurde anschließend mit HEGN (1 % Igepal CA-630 (v/v); 0 mM KCl) verdünnt, um die KCl-Konzentration auf 150 mM KCl einzustellen.

GST-Pulldown aus Kernextrakten

Materialien

- Kernextrakt
- Rekombinantes GST-Protein an GSH-Sepharose gebunden

Das Kernextrakt wurde mit HEGN-Puffer mit einer Igepal CA-630 Konzentration von 0,1 % (v/v) hergestellt. Für GST-*Pulldowns* mit anschließender Detektion durch Western Blot wurden 200-250 µg Kernextrakt mit 10 µl GST-Protein (ca. 3 µg) gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 2 h auf dem Drehrad mit anschließenden 15 min bei RT. Die GSH-Sepharose wurde bei 2000 x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 1 ml HEGN (0,1 % Igepal CA-630 und 150 mM KCl) hinzugegeben. Nach mehrmaligen Invertieren wurde wieder zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Insgesamt wurde die GSH-Sepharose viermal gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden HEGN-Reste mit einer Hamiltonspitze abgenommen und in dem gleichen Volumen 2x Proteinprobenpuffer wie GSH-Sepharose resuspendiert. Gebundene Proteine wurden durch Kochen bei 95°C für 5 min eluiert.

GST-Pulldown für eine massenspektrometrische Analyse

Materialien

- Imperial Stain (Pierce)

Für einen GST-Pulldown mit anschließender massenspektrometrischer Analyse wurden 4,5 mg Kernextrakt aus HCT116 Zellen und ca. 30 µg GST-Protein verwendet. Die Inkubation und Waschschrte erfolgten wie oben beschrieben. Nach der SDS-PAGE auf einem großen 8% SDS-Gel (Länge 20 cm) wurden die Proteine mit Imperial Stain (Pierce) gefärbt und die gewünschte Spur in 20 kleine Stücke geschnitten. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Hans Otto (MDC, Berlin-Buch) durchgeführt.

Immunpräzipitation (IP)

Materialien:

- Kernextrakt
- Antikörper oder krudes Kaninchenserum
- Protein A-Sepharose CL-4B (GE Life Sciences) in HEGN-Puffer (1/1 Volumen Sepharose:HEGN-Puffer)
- HEGN-Puffer mit 1% Igepal CA-630 und 150 mM KCl

Pro IP wurden 400 µl Kernextrakt mit einer Proteinkonzentration von 1,5 µg/µl verwendet. Um Bestandteile aus dem Kernextrakt zu entfernen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose binden, wurde das Kernextrakt für 60 min mit 30 µl Protein A-Sepharose auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand für die IP verwendet. Hierfür wurden 2-4 µg Antikörper oder 5 µl krudes Kaninchenserum pro 400 µl hinzugegeben und ü. N. auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde 30 µl Protein A-Sepharose hinzupipettiert und für eine weitere Stunde auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde anschließend bei 2000 x g für 2 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, 1 ml HEGN-Puffer hinzugegeben und nach mehrmaligem Invertieren wie zuvor zentrifugiert. Insgesamt wurde die Sepharose dreimal mit je 1 ml HEGN gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde die Sepharose mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und diese für 5 min mit 30 µl 2x SDS-Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Materialien:

- Fixierungslösung (1% Formaldehyd in PBS)
- 1 M Glycin
- Eiskaltes PBS mit 0,5 mM PMSF
- Dounce-Homogenisierer
- Hypotoner Lysepuffer
- ChIP-Sonifizierungspuffer
- ChIP-Waschpuffer A
- ChIP-Waschpuffer B
- Protein A oder Protein G Dynabeads (Invitrogen)
- ChIP-Elutionspuffer
- ChIP-Blockierungslösung
- 5 M NaCl
- RNase A (10 mg/ml in TE)
- Proteinase K (10 mg/ml)
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
- Glykogen (10 mg/ml)
- Stabsonifizierer (Branson 450)

Fixierung der Zellen und Isolation des Chromatins

Für eine ChIP wurden die Zellen auf 15 cm Schalen kultiviert und pro Immunpräzipitation wurden 5×10^6 - 1×10^7 Zellen verwendet.

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit 20 ml Fixierungslösung für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Abstoppen der Fixierung wurden je 2,5 ml Glycin hinzugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Ab diesem Schritt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C, wenn nicht anders beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 3 ml PBS abgekratzt. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 1000 x g wurden die Zellen pelletiert und in hypotonem Lysepuffer (ca. fünffache Menge des Zellvolumens) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellmembranen durch zwölf Stöße im Dounce-Homogenisierer aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 800 x g wurden die Zellkerne pelletiert und der Überstand (Cytoplasma) verworfen. Die Zellkerne wurden in Sonifizierungspuffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen pro ml erreicht wurde. Anschließend wurde das Lysat auf einem Drehrad für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in 2 ml Aliquots in 15 ml Falconröhrchen sonifiziert. Die Stärke und Dauer der Sonifizierungsschritte wurde so gewählt, dass eine DNA-Größe von 200-300 bp entstand und musste für jeden Zelltyp empi-

risch bestimmt werden. Nach der Sonifizierung wurde das Chromatin für 60 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand (lösliches Chromatin) wurde in ein Eppendorfgefäß überführt.

Binden des Antikörpers an die Dynabeads

Pro Antikörper wurden 15 µl Dynabeads mit 1-5 µg Antikörper in einem Volumen von 500 µl ChIP-Blocklösung ü. N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blocklösung entfernt und die Dynabeads in 1/10 des Volumens des Chromatins resuspendiert und zu diesem hinzugegeben.

Immunpräzipitation

Pro IP wurden 0,5-1 ml Chromatin für die IP eingesetzt, welches ü. N. mit den an Dynabeads gekoppelten Antikörper auf einem Drehrad inkubiert wurde. Anschließend wurden die Dynabeads wie unten beschrieben, gewaschen:

2x 1 ml ChIP-Sonifizierungspuffer

2x 1 ml ChIP-Waschpuffer A

2x 1 ml ChIP-Waschpuffer B

Nach jedem Waschschrift wurden die Dynabeads mittels eines Magneten sedimentiert, der Puffer abgenommen und neuer Puffer hinzugegeben. Jeder Waschschrift beinhaltete eine dreiminütige Inkubation auf dem Drehrad.

Elution und Aufreinigung der DNA

Nach dem letzten Waschschrift wurden Pufferreste entfernt, je 220 µl ChIP-Elutionspuffer hinzugegeben und anschließend unter starkem Schütteln für 15 min bei 65°C inkubiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit frischem Elutionspuffer wiederholt und die Überstände (400 µl) vereinigt. Anschließend wurden 16,8 µl 5 M NaCl hinzugegeben und ü. N. bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert, um die Kreuzvernetzung von DNA zu Proteinen und Proteinen untereinander aufzuheben. Am nächsten Tag wurde 1 µl RNase A hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde nach Zugabe von je 4 µl EDTA und 2 µl Proteinase K für 2 h bei 42°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine anschließende Phenol-Chloroform Extraktion und durch eine Ethanol-fällung in Anwesenheit von 30 µg Glykogen präzipitiert. Das resultierende Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend das Pellet luftgetrocknet und in 50 µl 10 mM Tris pH 7,4 aufgenommen. Für eine PCR wurden anschließend 1-2 µl pro PCR verwendet.

Sequentielle Chromatinimmunpräzipitation (Re-ChIP)

Materialien:

- s. Chromatin-Immunpräzipitation
- E2F3-Peptid (Santa Cruz; sc-878P)

Für eine Re-ChIP wurde die fünffache Zellzahl und Antikörpermenge einer normalen ChIP verwendet. Bis zum Waschen erfolgte das Vorgehen wie bei der normalen ChIP. Es wurde nur dreimal mit Sonifizierungspuffer gewaschen und anschließend noch vorhandene Flüssigkeitsreste mit einer Hamiltonspritze entfernt. Zur Elution der IP wurde dasselbe Peptid aus E2F3 verwendet, welches auch zur Immunisierung verwendet wurde und somit auch zur Kompetition von Antigen-Antikörperkomplexen verwendet werden kann. Hierzu wurde die Sepharose in 35 µl Peptidlösung resuspendiert und 25 µl des Eluates in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Elution wurde nochmal wie zuvor wiederholt und die beiden Eluate (50 µl) vereinigt. Die Eluate wurden in 500 µl Sonifizierungspuffer verdünnt und die ChIP wurde ab jetzt wie bei der normalen ChIP fortgeführt.

ChIP gekoppelt mit *deep sequencing* (ChIP-Seq)

Materialien:

- ChIP-DNA
- Genomic Sample Prep Kit (Illumina)
- PCR Purification Kit (Qiagen)
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)
- MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
- 2100 Bioanalyzer (Agilent)

Für ein ChIP-Seq Experiment wurde eine ChIP mit 10^8 Zellen durchgeführt und 10 µg E2F3-Antikörper (Santa Cruz; Sc-878) oder 10 µg IgG (Sigma) für die IP verwendet. Die DNA wurde nicht durch eine Ethanolfällung, sondern mit Hilfe einer MinElute PCR Purification Säule (Qiagen) in 11 µl EB eluiert. Die sonstige ChIP-Prozedur entspricht dem oben beschriebenen Protokoll für eine Chromatin-Immunpräzipitation. Die nachfolgend verwendeten Reagenzien sind, mit Ausnahme der Qiagen Kits, alle Bestandteil des Genomic Sample Prep Kits von Illumina.

Reparatur der DNA-Enden

Zunächst werden die Enden der ChIP-DNA aufgefüllt, so dass aus bestehenden überhängenden Enden sogenannte *blunt ends* der ChIP-DNA entstehen.

ChIP-DNA 10 µl

10x T4 Ligase Puffer 10 µl

dNTP Mix 4 µl

T4 DNA Polymerase 5 µl

Klenow Polymerase 1 µl

T4 PNK 5 µl

ad 100 µl ddH₂O

20 min bei 30°C

Die DNA wurde daraufhin mittels einer *PCR Purification* Säule (Qiagen) entsprechend der Anleitung aufgereinigt und mit 32 µl EB eluiert.

Ligation der Adapter

Im Folgenden werden A'-Überhänge am 3'-Ende der DNA eingeführt, welche später für die Ligation der Adapter benötigt werden.

ChIP-DNA 32 µl

NEB Puffer 25 µl

dATP 10 µl

Klenow (3' 5' exo-) 3 µl

30 min bei 20°C

Die DNA wurde anschließend mittels einer *MinElute PCR Purification* Säule (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit 10 µl EB eluiert.

Ligation der Adapter an die ChIP-DNA

Hier werden die Adapter (aus dem Sample Prep Kit) mittels der A'-Überhänge an die ChIP-DNA ligiert. Die Adapter dienen zum einen zur späteren Amplifikation mittels PCR und zum anderen sind sie später für die *Cluster*-Generierung und die anschließende Sequenzierung nötig.

ChIP-DNA 10 µl

DNA Ligasenpuffer 25 µl

Adapter (1:40 verdünnt) 4,8 µl

DNA Ligase 5 µl

ad 50 µl ddH₂O

15 min bei RT

Die DNA wurde anschließend mittels einer *MinElute PCR Purification* Säule (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit 11 µl EB eluiert.

Amplifikation der Adapter-ligierten ChIP-DNA

In diesem Schritt wird die DNA mit Hilfe von Oligonukleotiden (aus dem Sample Prep Kit) per PCR amplifiziert, welche komplementär zu den ligierten Adaptern sind.

ChIP-DNA 10 µl

Phusion DNA Polymerase 25 µl

PCR Primer 1. 11 µl

PCR Primer 2. 11 µl

ad 50 µl ddH₂O

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet

98°C 30 sec

98°C 10 sec I

65°C 30 sec I => 22 Zyklen

72°C 45 sec I

72°C 5 min

4°C unendlich

Die DNA wurde daraufhin mittels einer *PCR Purification* Säule (Qiagen) entsprechend der Anleitung aufgereinigt und mit 35 µl EB eluiert.

Größenselektion der ChIP-Bibliothek

Um eine bessere Auflösung bei ChIP-Seq Experimenten zu erlangen und während der PCR entstandene Adapter-Dimere von der Bibliothek zu trennen, wurde die PCR-amplifizierte DNA auf einem 2%-Agarosegel aufgetrennt und der Größenbereich zwischen 200-300 bp ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe eines *MinElute Gel Extraction Kits* (Qiagen) aufgereinigt und mit 15 µl EB eluiert. Die Größenverteilung und Quantität der DNA wurde anschließend durch einen Bioanalyzer-Chip (Agilent) analysiert (freundlicherweise von Svetlana Lebedewa durchgeführt) analysiert und diese anschließend für die *Cluster* Generierung und Sequenzierung (ebenfalls von Svetlana Lebedewa durchgeführt) verwendet.

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Materialien:

- Acrylamid (30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid Lösung; Roth)
- 0,5 M Tris-Cl pH 6,8 (Sammelgel)
- 1,5 M Tris-Cl pH 8,8 (Trenngel)
- 20% SDS (w/v)
- TEMED (Fluka)
- 10% Ammoniumpersulfat (w/v)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese [146] unter denaturierenden Bedingungen. Das Trenngel wurde bis zur Auspolymerisation mit Isobutanol überschichtet. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde mit SDS-Probenpuffer

(ESB) versetzt, für 5 min bei 95° C inkubiert und mit einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei den verwendeten Biorad Minigelen bei 120 V in 1x SDS Laufpuffer.

Nachweis von Proteinen durch Coomassiefärbung

Materialien:

- Färbelösung: Imperial Protein Stain (Pierce)

Zur Detektion von Proteinen in SDS-Gelen wurden diese nach Angaben von Pierce gefärbt. Hierfür wurden die Gele 3x5 min mit Wasser unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend für mehrere Stunden mit Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel durch mehrere Waschschriffe mit Wasser entfärbt.

Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Materialien

- Whatmanpapier
- Nassblot-Vorrichtung (Biorad)
- Blotpuffer
- PVDF Polyvinylidendifluorid-Membran (Roth)
- Methanol

Die PVDF-Membran wurde eine Minute in Methanol inkubiert und wurde anschließend für 2 min im Blotpuffer äquiliбриert. Für den genauen Aufbau des Western Blots s. die Anleitung von Biorad. Der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von 140 mA pro Gel für 1h.

Western-Blot

Materialien:

- PBST (0,05% Tween-20 in PBS)
- PBST-Blotto (5% Magermilchpulver (w/v) in PBST)
- Immobilon ECL (Millipore)
- ECL-Film (GE Life Sciences)

Die Membran wurde für eine halbe Stunde in Blocklösung auf der Wippe geblockt und später mit dem Primärantikörper (in Blocklösung verdünnt) ü. N. bei 4° C oder 1 h bei RT schüttelnd

inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBST für 5 min auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde sie für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (in PBST-Blotto) behandelt. Im Folgenden wurde wie bei dem Primärantikörper gewaschen, die Membran mit Luminolsubstrat inkubiert und ein ECL-Film in der Dunkelkammer aufgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 HELLS ist ein neuer essenzieller Kofaktor von E2F3

3.1.1 Ermittlung neuer Interaktionspartner mittels GST-Pulldown

Um neue potenzielle Interaktionspartner von E2F3 zu identifizieren, wurde ein so genannter GST-Pulldown Ansatz gewählt. Hierfür wurde bakteriell exprimiertes GST-E2F3b mit Kernextrakten von HCT116 Zellen inkubiert, die gebundenen Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 3.1A).

Für diesen Ansatz wurde E2F3b und nicht E2F3a als Fusionsprotein verwendet, da GST-E2F3a unter nativen Bedingungen nicht aus *E. coli* Bakterien aufgereinigt werden konnte und somit nicht sichergestellt war, dass das Protein in seiner nativen Konformation vorlag. Dies ist allerdings essenziell, um Artefakte in diesem Ansatz zu vermeiden. Da sich jedoch E2F3a und E2F3b ausschließlich in einem Teil des N-Terminus unterscheiden und somit DNA-Bindungsdomäne, Dimerisierungsdomäne und Transaktivierungsdomäne identisch sind (s. Abb. 1.5), ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass E2F3b-interagierende Proteine auch an E2F3a binden.

Nach der Coomassie-Färbung (Abb. 3.1A) waren deutlich mehr Banden in jener Spur sichtbar, bei welcher das GST-E2F3b-Fusionsprotein mit Kernextrakt inkubiert wurde (Spur 4), als in jener Spur, bei der das Kernextrakt nur mit aufgereinigtem GST-Protein inkubiert wurde (Spur 3). Dies ließ vermuten, dass die Proteine in Spur 4 spezifisch mit E2F3b interagierten. Als weitere Kontrolle wurde für die beiden bakteriell exprimierten Proteine auch eine Kontrolle aufgetragen, die kein Kernextrakt in der Bindungsreaktion enthielt (Spur 1-2). Hier waren ebenfalls keine Banden sichtbar, was zeigt, dass die Proteine in Spur 4 nicht von bakteriellen Proteinen stammen, die mit GST-E2F3b interagieren.

Um die Identität der Proteine zu bestimmen, wurde die Spur 4 in 20 einzelne Stücke geschnitten und diese mittels Massenspektrometrie analysiert.

Mit diesem Ansatz konnten über 100 potenzielle Interaktionspartner von E2F3b identifiziert werden (komplette Liste s. Anhang), wobei betont werden muss, dass in dieser Liste vermutlich auch diverse GST-bindende Proteine vorhanden sind, da die GST-Probe (Spur 3) nicht als Vergleich massenspektrometrisch untersucht wurde. Jedoch waren in der Liste schon

beschriebene E2F-Interaktionspartner, wie z. B. TIF1BETA [147, 148] oder TRRAP [149] vorhanden, was zeigt, dass dieser Ansatz geeignet ist, um Interaktionspartner zu finden.

Ein potenzieller Interaktionspartner war das L3MBTL3 Protein. Es wurde schon eine physikalische Interaktion von L(3)MBTL und dE2F2 in *Drosophila* nachgewiesen [150]. Somit handelt es sich hierbei auch um einen guten Kandidaten für ein E2F3b-interagierendes Protein. Dies wurde jedoch im Verlaufe dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Ein weiteres identifiziertes Protein war die SNF2-ähnliche Helikase HELLS (s. Kap. 1.10), welches mit 19 unterschiedlichen Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 16% detektiert wurde. Bei HELLS handelt es sich um einen potenziellen *Chromatin Remodelling*-Faktor, dessen Rolle bis jetzt ausschließlich bei der Repression von Zielgenen beschrieben wurde (s. Kap 1.11).

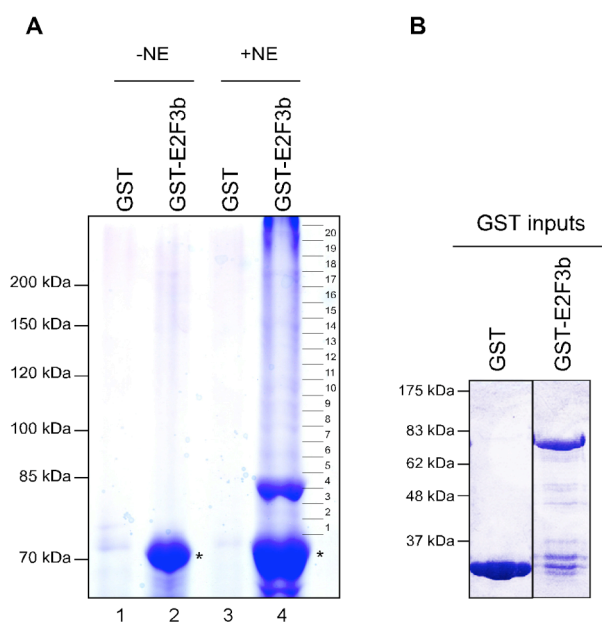


Abb. 3.1: Identifizierung von E2F3b-interagierenden Proteinen

A) Kernextrakte von HCT116 Zellen wurden mit den angegebenen Fusionsproteinen inkubiert und nach Elution über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Je eine Probe ohne Kernextrakt (-NE) diene als Kontrolle für bakterielle Proteine, welche mit GST-E2F3b interagieren könnten (Spur 1-2). Das Gel wurde daraufhin mit Coomassie gefärbt, um die Proteine zu visualisieren. Die Spur 4, wurde in 20 kleine Stücke geschnitten (1-20) und per Massenspektrometrie analysiert. Das GST-E2F3b Protein ist mit einem Stern gekennzeichnet. **B)** Ein Aliquot der verwendeten GST-Proteine wurde parallel mit Coomassie gefärbt, um die Reinheit und relative Menge zu überprüfen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Interaktion von HELLS und E2F3 genauer untersucht, da *E2f3*-defiziente und *Hells*-defiziente MEFs einen sehr ähnlichen Phänotyp aufwei-

sen. So zeigen z. B. beide *Knockout*-MEFs einen Zellzyklusdefekt, eine p19^{Arf}- und p21^{CIP}-Induktion, sowie einen Transformations-defekt [78, 88, 140, 151]. Dies ließ vermuten, dass HELLS und E2F3 in einem gemeinsamen Signalweg involviert sein könnten, weshalb die potenzielle Interaktion dieser beiden Proteine genauer charakterisiert wurde.

3.1.2 HELLS interagiert mit E2F3a/b *in vitro* und *in vivo*

Um zunächst auszuschließen, dass es sich bei der Identifizierung von HELLS um einen Artefakt der Massenspektrometrie handelte, wurde zunächst das gleiche Experiment wie in Abb. 3.1 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass HELLS hier mit einem spezifischen Antikörper per Western Blot nachgewiesen wurde (Abb. 3.2).

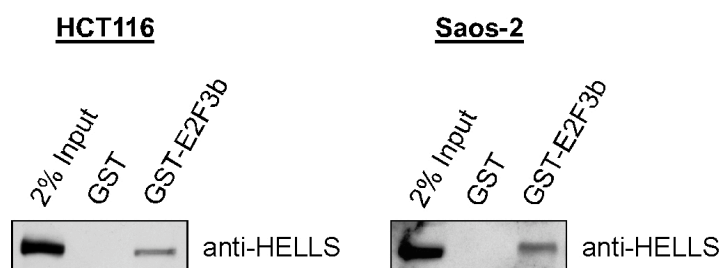


Abb. 3.2: HELLS interagiert mit E2F3b unabhängig von pRB

Kernextrakte von HCT116 Zellen oder Saos-2 Zellen wurden mit den angegebenen Fusionsproteinen inkubiert und nach mehrmaligem Waschen und Elution auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis von HELLS erfolgte mit einem HELLS-spezifischen Antikörper.

In diesem Experiment konnte die Interaktion bestätigt werden und es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Interaktion unabhängig von pRB erfolgt, da auch bei Verwendung von Kernextrakten aus der pRB-defizienten Zelllinie Saos-2 eine Bindung von HELLS an GST-E2F3b detektierbar war.

Um die Bindung auch *in vivo* zu bestätigen und gleichzeitig zu untersuchen, ob HELLS auch mit E2F3a interagieren kann, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt (Abb. 3.3). Hierfür wurden HeLa-Zellen mit HA-E2F3a- oder HA-E2F3b-Konstrukten transfiziert. Bei diesem Experiment konnte endogen exprimiertes HELLS in den Immunpräzipitaten

der Proben detektiert werden, bei denen HA-E2F3a (Spur 2) oder HA-E2F3b (Spur 3) überexprimiert wurde, jedoch nicht in den Leervektor-transfizierten Proben (Spur 1).

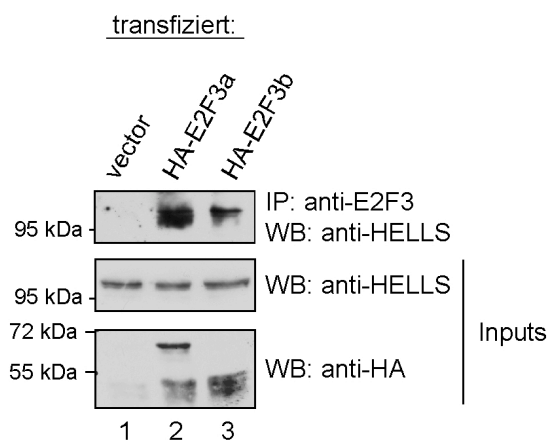


Abb. 3.3: Überexprimiertes HA-E2F3a und HA-E2F3b interagiert mit endogenem HELLS

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und Kernextrakte von den Zellen hergestellt. E2F3a und E2F3b wurden mit einem E2F3a/b-spezifischen Antikörper immun-präzipitiert und gebundenes HELLS über einen Western Blot detektiert. E2F3a zeigt eine Degradationsbande, die auf Höhe von E2F3b läuft (Vgl. Spur 2 und Spur 3 bei den Inputs des HA Western Blots).

Um auszuschließen, dass es sich hier um einen Überexpressionsartefakt handelte, wurde die Interaktion auch durch endogene Ko-Immunpräzipitation bestätigt. HELLS konnte nach einer Immunpräzipitation von E2F3 in dem E2F3-Immunpräzipitat nachgewiesen werden, jedoch nicht bei einer Immunpräzipitation mit Präimmunserum (Abb. 3.4A). Um zu unterscheiden, ob diese Interaktion indirekt über DNA vermittelt wird, wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit von Ethidiumbromid (EtBr) wiederholt. Hier ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie in Abwesenheit von EtBr, so dass die beobachtete Interaktion unabhängig von DNA ist.

Bei dem für die Immunpräzipitation verwendeten E2F3-Serum handelt es sich um ein Antiserum, das im Zuge dieser Arbeit produziert wurde. Somit wurde zusätzlich die Spezifität dieses Serums untersucht, um eine Kreuzreaktion mit anderen E2F-Proteinen auszuschließen. Hierfür wurde HA-E2F1, HA-E2F3a oder HA-E2F4 in Gegenwart von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert und für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend per Autoradiographie detektiert. Hier zeigte sich, dass der Antikörper hochspezifisch für E2F3 ist, da kein HA-E2F1 oder HA-E2F4 mit dem Antikörper immunpräzipitiert wurde (Abb. 3.4B).

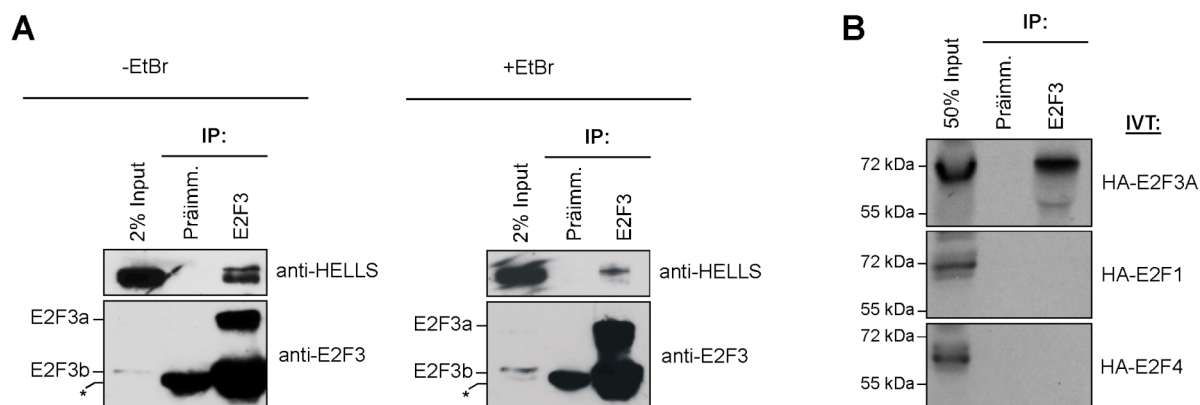


Abb. 3.4: Endogene Interaktion von HELLS und E2F3 in Kernextrakten von HCT116 Zellen

A) Endogenes E2F3a/b wurde aus Kernextrakten in Abwesenheit (-EtBr) oder Anwesenheit von 1 µg/ml Ethidiumbromid (+EtBr) von HCT116 Zellen immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde parallel eine Immunpräzipitation mit Präimmunserum (Präimm.) durchgeführt. Nach Auftrennung durch eine SDS-PAGE wurde E2F3 und kopräzipitiertes HELLS per Western Blot detektiert. Die schwere Kette des Antikörpers ist durch einen Stern gekennzeichnet. **B)** Immunpräzipitation mit den angegebenen ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten Proteinen zeigt die Spezifität des in A) verwendeten Antiserums. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine per Autoradiographie detektiert. IVT = *in vitro* Translation.

3.1.3 HELLS interagiert mit der *Marked Box*-Domäne von E2F3

Um diejenige Domäne von E2F3 zu bestimmen, welche für die Interaktion mit HELLS verantwortlich ist, wurden verschiedene Deletionsmutanten von E2F3b (s. Abb. 3.5A) kloniert und als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Da schon zuvor gezeigt wurde, dass HELLS sowohl mit E2F3a als auch mit E2F3b interagieren kann (Abb. 3.3), wurde hier von dem etwas kürzeren E2F3b ausgegangen.

Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden anschließend mit Kernextrakten aus HCT116 Zellen inkubiert und gebundenes HELLS per Western Blot detektiert (s. Abb. 3.5B). Hierbei zeigten alle außer der Deletionsmutante 3 (Spur 5) eine detektierbare Interaktion. Diese Mutante war die einzige Mutante, bei der die *Marked Box* und eine angrenzende Region deletiert wurde. Die *Marked Box*-Domäne mit der angrenzenden Region von E2F3 ist somit notwendig und hinreichend für die Interaktion mit HELLS, da die Deletionsmutante 5 (Spur 7), bestehend nur aus der *Marked Box*-Domäne mit der angrenzenden Region, eine gleich starke Interaktion wie GST-E2F3b (Spur 2) zeigte.

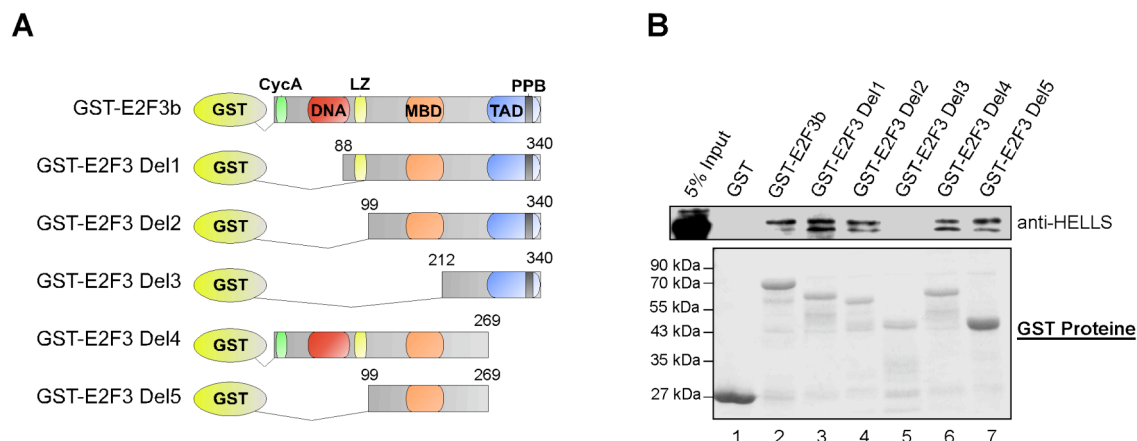


Abb. 3.5: HELLS interagiert mit der *Marked Box*-Domäne von E2F3

A) Darstellung der verwendeten Deletionsmutanten von E2F3b. CycA = Cyclin A-bindende Domäne, DNA = DNA-Bindungsdomäne, LZ = *Leucine Zipper*, MBD = *Marked Box*-Domäne, TAD = Transaktivierungsdomäne, PPB = *Pocket Protein*-Bindungsdomäne. Die Aminosäurereste sind jeweils als Zahl angegeben. **B)** HCT116 Kernextrakte wurden mit den angegebenen Fusionsproteinen inkubiert und gebundenes HELLS per Western Blot detektiert (oberer Teil). Die Reinheit und relative Menge der eingesetzten GST-Proteine wurde per SDS-Gel mit anschließender Färbung durch Coomassie überprüft (unterer Teil).

3.1.4 E2F3 interagiert mit dem N-Terminus von HELLS

Um im Gegenzug die verantwortliche Region von HELLS für die Interaktion mit E2F3 zu bestimmen, wurden auch von HELLS verschiedene Deletionsmutanten kloniert und als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. HELLS als Protein voller Länge war in *E. coli* nicht in löslicher Form exprimierbar, weshalb nur drei Teilstücke exprimiert wurden. Zusätzlich zur Bestimmung der Interaktionsdomänen sollte hier untersucht werden, ob HELLS auch mit anderen E2F-Proteinen interagieren kann oder ob es spezifisch mit E2F3 interagiert. Hierfür wurden HA-E2F1, HA-E2F3a oder HA-E2F4 in Gegenwart von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert, mit den angegebenen Fusionsproteinen inkubiert und die gebundenen Proteine nach einer SDS-PAGE per Autoradiographie detektiert. Hier war zu beobachten, dass die Bindung von HELLS an E2F3 hauptsächlich über seinen N-Terminus erfolgt, da HA-E2F3a am stärksten an GST-HELLS 1 band (Abb. 3.6B; Spur 3). Jedoch konnte auch eine, wenn auch bedeutend schwächere, Interaktion mit den beiden anderen Fusionsproteinen der SNF2-ähnlichen Domäne detektiert werden (Spur 4 und 5), so dass E2F3 womöglich über mehrere Stellen an HELLS bindet. Zusätzlich konnte hier demonstriert werden, dass die Interaktion spezifisch für E2F3 ist, da weder bei HA-E2F1 noch bei HA-E2F4 eine Bindung an eines der Fusionsproteine zu beobachten war.

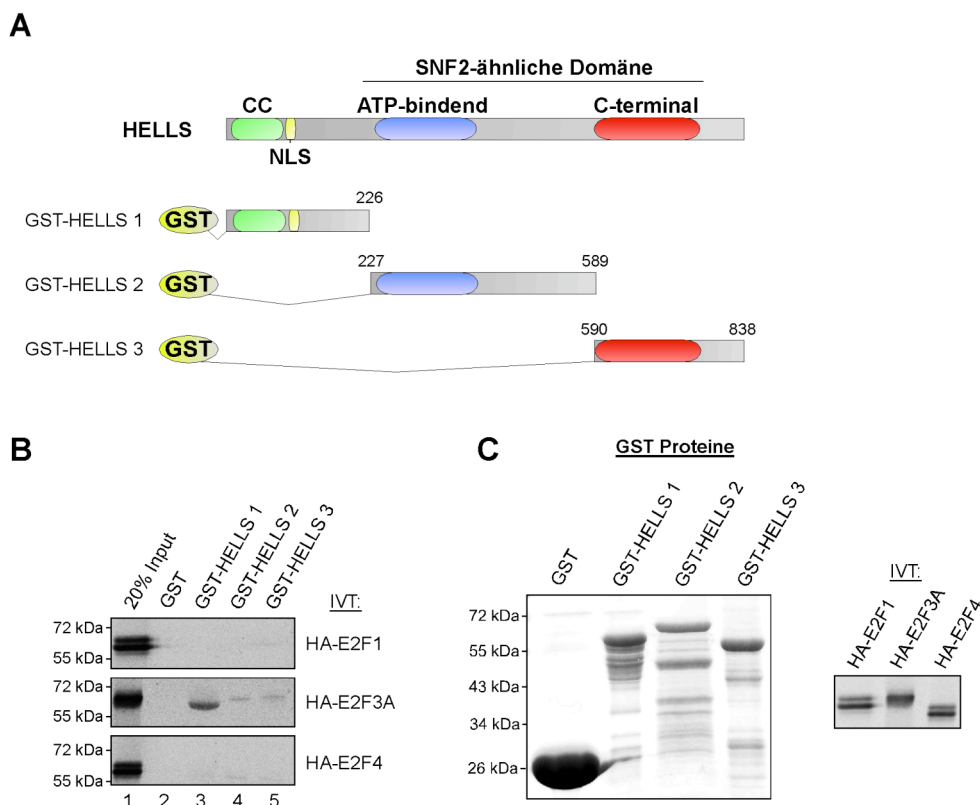


Abb. 3.6: HELLs interagiert über seinen N-Terminus ausschließlich mit E2F3

A) Graphische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine. CC = *Coiled Coil*, NLS = nukleäres Lokalisationssignal. Die jeweiligen Aminosäurereste sind als Zahlen angegeben. **B)** HA-E2F1, HA-E2F3a oder HA-E2F4 wurde über ^{35}S -Methionin während der *in vitro* Translation radioaktiv markiert und mit den angegebenen GST-Proteinen inkubiert. Gebundene Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Autoradiographie detektiert. **C)** Die verwendeten GST-Fusionsproteine wurden nach einer SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Zudem ist eine kürzere Exposition der in B) verwendeten *in vitro* translatierten Proteine dargestellt, um besser die relativen Mengen vergleichen zu können.

3.1.5 HELLs bindet an die Promotoren von E2F-Zielgenen

Die vorigen Versuche belegten, dass HELLs und E2F3 miteinander physikalisch interagieren können. Nun stellte sich die Frage, ob HELLs als potenzieller *Chromatin Remodelling*-Faktor an E2F-Zielgene bindet. Um dies zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs) für E2F3 und HELLs von asynchron wachsenden HCT116 Zellen durchgeführt. Hiermit wurde überprüft, ob HELLs an den schon beschriebenen E2F-regulierten Promotoren *CCNB1* (codiert für Cyclin B1), *MCM4*, *PCNA* oder *p107* [117, 152] detektiert werden kann. Der nicht E2F-regulierte *LEFTY2* Promotor diene als Negativkontrolle. In diesen Experimenten konnten sowohl E2F3 als auch HELLs an den zuvor genannten E2F-regulierten Promotoren nachgewiesen werden, was zeigt, dass HELLs *in vivo* an die Promotoren von E2F-Zielgenen binden kann.

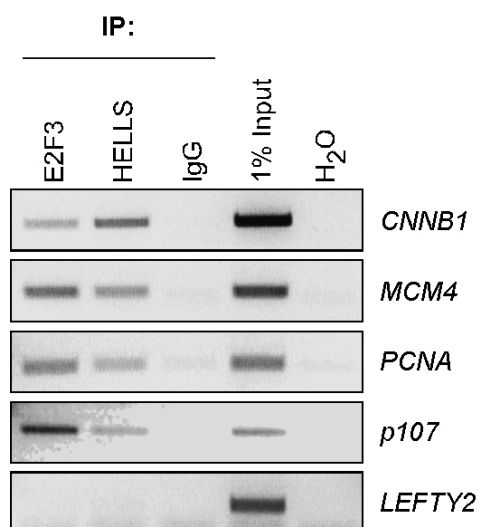


Abb. 3.7: HELLS bindet an E2F-regulierte Promotoren

Formaldehydfixiertes Chromatin von HCT116 Zellen wurde mit Antikörpern gegen E2F3, HELLS oder unspezifischem IgG (als Kontrolle) immunpräzipitiert. Die präzipitierte und aufgereinigte DNA wurde anschließend per PCR mit Primern amplifiziert, die in der Promotorregion der angegebenen Promotoren liegen. Der *LEFTY2* Promotor diente hier als Negativkontrolle.

3.1.6 E2F3 und HELLS binden gemeinsam an den p107 Promotor

Die vorige ChIP zeigte zwar, dass E2F3 und HELLS an den gleichen Promotoren detektiert werden können, jedoch beweist dieses Ergebnis noch nicht, dass sie zusammen an diese Promotoren binden. Es wäre auch denkbar, dass in Zelle A E2F3 ohne HELLS an die DNA bindet und in Zelle B HELLS wiederum unabhängig von E2F3 auch an diesen Promotor bindet. Bei einer ChIP gegen E2F3 oder HELLS wäre somit eine Bindung der beiden Proteine an dem untersuchten Promotor detektierbar, auch wenn diese nie gemeinsam an diesen Promotor binden würden. Um der Frage nachzugehen, ob E2F3 und HELLS zusammen an Zielgene binden können, wurde ein Re-ChIP Experiment durchgeführt. Hierfür wurde ein leicht modifiziertes ChIP-Protokoll etabliert (Abb. 3.8A). Da der hier verwendete E2F3-Antikörper gegen ein Peptid in E2F3 gerichtet ist, kann nach der E2F3-IP, durch Zugabe des Peptids im Überschuss, die Antigen-Antikörper Wechselwirkung wieder aufgelöst werden, ohne den Antikörper von der Protein A-Sepharose zu eluieren. Anschließend kann das Eluat für eine zweite IP eingesetzt werden. Falls trotzdem ein Teil des E2F3-Antikörpers eluiert wurde, wird dieser durch den Überschuss des Peptids in der zweiten IP weiter inaktiv gehalten und kann somit bei der Re-IP nicht wieder immunpräzipitieren.

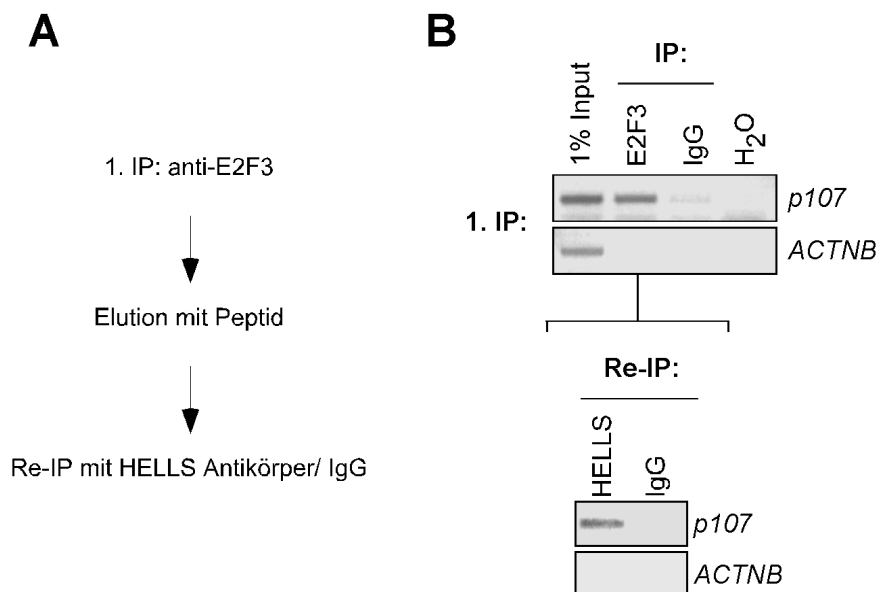


Abb. 3.8: HELLS und E2F3 binden gemeinsam an den *p107* Promotor

A) Schematische Darstellung der Re-ChIP Prozedur. **B)** Chromatin von HCT116 Zellen wurde mit einem E2F3-spezifischen Antikörper oder IgG (als Kontrolle) immunpräzipitiert (1. IP) und nach mehrmaligem Waschen mit Peptid eluiert. Das Eluat der E2F3-IP wurde in eine zweite IP (Re-IP) gegen HELLS eingesetzt. IgG diente hier ebenfalls als Kontrolle. Per PCR wurde jeweils die Bindung an den *p107* Promotor oder den *ACTNB* Promotor als Negativkontrolle untersucht.

Mit Hilfe dieses modifizierten ChIP-Protokolls konnte E2F3 spezifisch an dem *p107* Promotor und nicht dem beta-Actin Promotor (*ACTNB*) nachgewiesen werden, so dass die Elution mit dem Peptid erfolgreich war (Abb. 3.8B). Zum anderen war nach anschließender Re-IP mit einem HELLS-Antikörper oder IgG (als Kontrolle) HELLS an dem *p107* Promotor detektierbar. Diese Anreicherung war spezifisch für *p107*, da an dem *ACTNB* Promotor keine Bindung detektierbar war. Dies beweist, dass HELLS und E2F3 gemeinsam an den *p107* Promotor binden.

3.1.7 E2F3 rekrutiert HELLS zu Promotoren

Es wurde zuvor gezeigt, dass HELLS an den untersuchten E2F-regulierten Promotoren nachgewiesen werden kann und gemeinsam mit E2F3 an den *p107* Promotor bindet. Dies ist jedoch noch kein Beweis, dass wirklich E2F3 diesen potenziellen *Chromatin Remodelling*-Faktor zu den Promotoren rekrutiert. Man kann hier nicht ausschließen, dass HELLS über einen anderen Faktor als E2F3 an Promotoren bindet. Um zu untersuchen, ob HELLS über E2F3 rekrutiert werden kann, wurde in diesem Experiment ein tamoxifeninduzierbares HA-ER-E2F3a System verwendet. Per retroviraler Infektion wurden T98G Zellen hergestellt, die

stabil dieses Fusionsprotein überexprimieren, wobei die HA-ER-E2F3a Überexpression zu keiner Veränderung der HELLS Expression führte (Abb. 3.9A).

Bei HA-ER-E2F3a handelt es sich um ein Fusionsprotein aus E2F3a und der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors [153]. Durch Bindung von HSP90 Proteinen wird dieses Fusionsprotein im Cytoplasma gehalten und transloziert nach Zugabe des Östrogenanalogons 4-Hydroxytamoxifen (OHT) in den Zellkern und bindet an seine Zielgene. Hier ist zu erwähnen, dass es sich bei dem Teil des Östrogenrezeptor um eine Punktmutante handelt, die kein natürliches Östrogen mehr binden kann und auch keine Transaktivierungseigenschaften mehr besitzt [154]. Zudem besitzt dieser Teil des Östrogenrezeptors zusätzlich ein HA-Epitop, welches zur Detektion des Fusionsproteins genutzt werden kann.

Zunächst wurde überprüft, ob HELLS und HA-ER-E2F3a in der Immunfluoreszenz nach OHT-Induktion kolokalisieren (Abb. 3.9B). Hier war eine Kolokalisation von endogenem HELLS und HA-ER-E2F3a in diesen Zellen zu beobachten, auch wenn die Interpretation dieser Ergebnisse durch die breite Lokalisation von HA-ER-E2F3a erschwert ist. Interessanterweise konnte man beobachten, dass sowohl HELLS als auch HA-ER-E2F3 von den besonders DAPI-reichen Domänen des Kerns ausgespart werden (Abb. 3.9C), welche typisch für die dicht gepackten Heterochromatinbereiche sind. Dies steht im Widerspruch zu vorigen Publikationen, die eine präferenzielle Assoziation von HELLS mit Bereichen des konstitutiven Heterochromatins (wie Zentromerbereichen) nachgewiesen haben [155, 156]. Diese Diskrepanz könnte unter anderem durch unterschiedliche verwendete Antikörper und/oder Unterschiede in den benutzten Zelltypen zustande kommen.

Das OHT-induzierbare ER-E2F3-System wurde hier verwendet, da es ermöglicht, die Rekrutierung von Kofaktoren in einem sehr engen Zeitfenster von wenigen Minuten zu beobachten [117]. Aus diesem Grund wurde hier eine ChIP gegen HA-ER-E2F3 und HELLS nach OHT-Induktion durchgeführt, um die Bindung des Fusionsproteins und die mögliche Rekrutierung von HELLS zu E2F-regulierten Promotoren zu untersuchen.

Wie in Abb. 3.9D zu sehen ist, kann eine Stunde nach der OHT-Zugabe HA-ER-E2F3 per ChIP an den E2F-Zielgenen *CDC6*, *p107*, *MCM4* oder *PCNA* detektiert werden. Die Rekrutierung an Promotoren war spezifisch für E2F-regulierte Promotorregionen, da 2 Kilobasen oberhalb des *p107* Transkriptionsstarts (*p107* +2kb TSS) keine induzierte Bindung beobachtet werden konnte. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer durchgeführten ChIP gegen HELLS, so dass HELLS nach OHT-Induktion ebenfalls an den Promotoren der E2F-Zielgene verstärkt nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich war hier zu beobachten, dass HELLS an den untersuchten E2F-Zielgenen in den uninduzierten Zellen nur sehr schwach an den E2F-regulierten Genen gegenüber der Kontrollregion angereichert war.

Im Laufe dieser Arbeit wurde wiederholt versucht eine endogene Bindung von HELLS an die E2F-regulierten Promotoren in T98G Zellen wie bei den HCT116 Zellen (s. Abb. 3.7) und MEFs (s. Abb. 3.10A) nachzuweisen. Dies war jedoch nicht erfolgreich. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass HCT116 Zellen mehr HELLS und E2F3 exprimieren, auch wenn dies nicht weiter untersucht wurde. Nichts desto trotz zeigt dieser Versuch, dass eine induzierte Rekrutierung von E2F3 gleichzeitig zu einer erhöhten Bindung von HELLS an den untersuchten Promotoren führt.

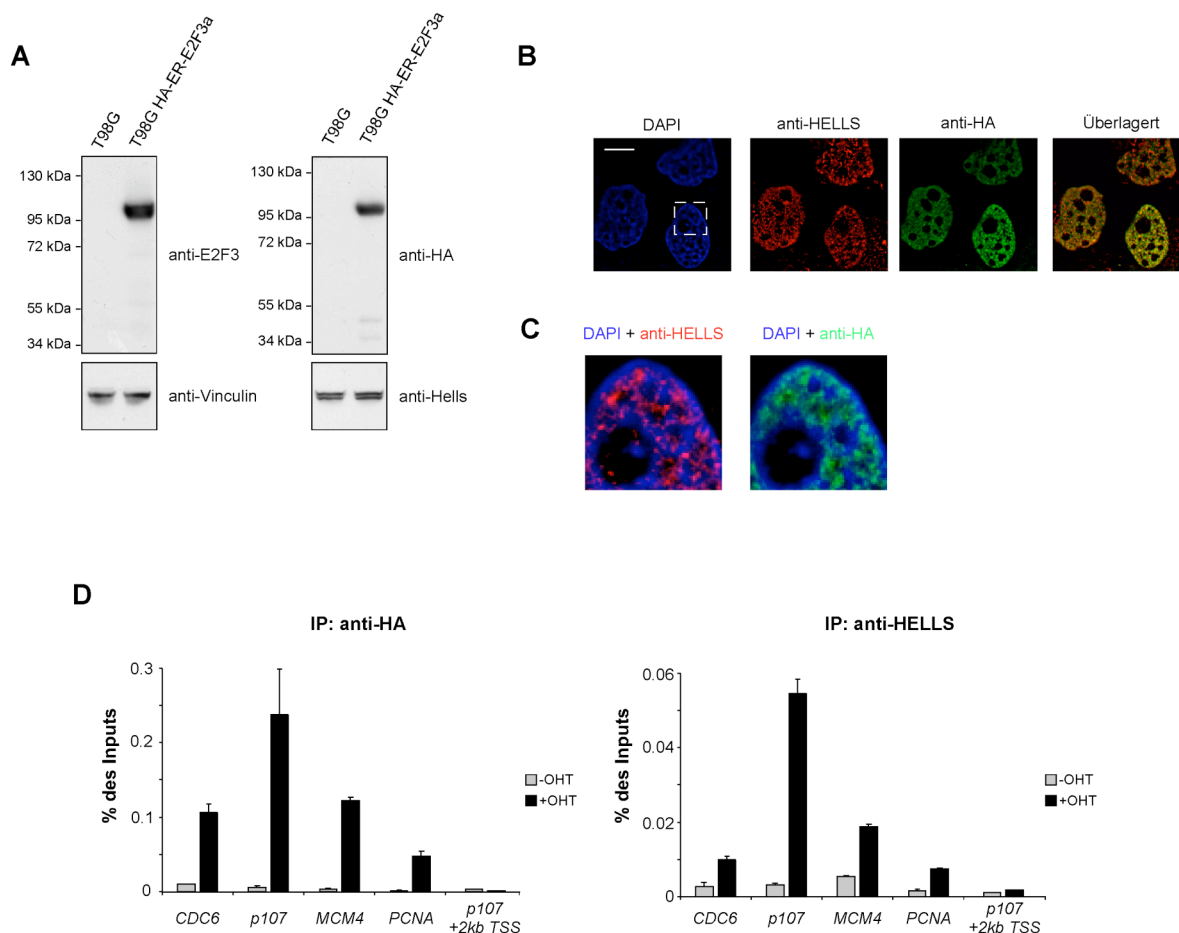
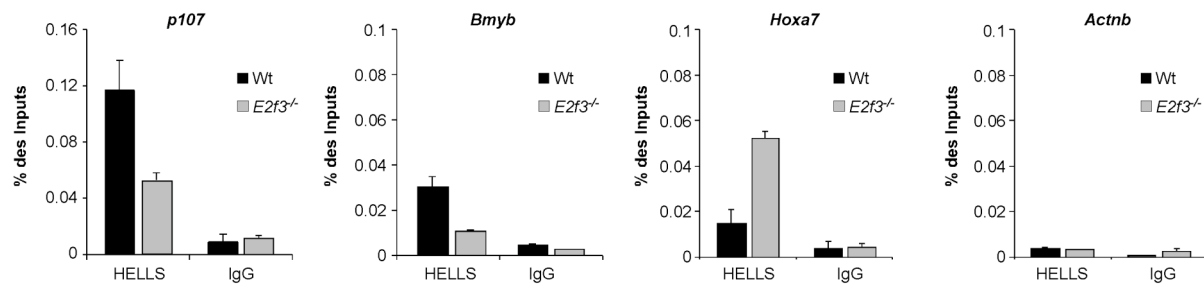


Abb. 3.9: HA-ER-E2F3a rekrutiert HELLS zu E2F-regulierten Zielpromotoren

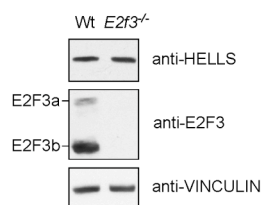
A) Kontrolle der Überexpression des HA-ER-E2F3 Proteins. VINCULIN dient hier als Ladekontrolle. **B)** *Deconvolution*-Immunfluoreszenz von OHT-induzierten T98G HA-ER-E2F3a Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit 300 nM OHT behandelt und anschließend wurden die angegebenen Antikörper für die Immunfluoreszenz verwendet. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m und das Bild hat eine Tiefe von ca. 0,4 μ m. **C)** Vergrößerung der gestrichelten Region aus B). Dargestellt sind die überlagerten Bilder von DAPI mit der HELLS-Färbung oder DAPI mit der HA-Färbung. **D)** T98G HA-ER-E2F3a Zellen wurden entweder für eine Stunde mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle (-OHT) oder 300 nM 4-Hydroxytamoxifen (+OHT) behandelt und anschließend für eine ChIP prozessiert. Das Chromatin wurde entweder mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop oder gegen HELLS immunpräzipitiert und die DNA für eine qPCR eingesetzt. Hierbei wurden die E2F-Zielgene *CDC6*, *p107*, *MCM4* und *PCNA*, sowie eine Region 2 kb oberhalb des Transkriptionsstarts vom *p107* Promotor (*p107* +2 kb TSS) als Negativkontrolle untersucht. Die qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert ($MW \pm SD$) an.

Um im Gegenzug zu überprüfen, ob die Abwesenheit von E2F3 auch zu einer verminderten Rekrutierung von HELLS führt, wurde eine ChIP gegen HELLS mit Chromatin von Wildtyp MEFs und *E2f3*^{-/-} MEFs durchgeführt (Abb. 3.10). Hier war eine zwei- bis dreifach verminderte Bindung von HELLS an die beiden untersuchten E2F-Zielgene *Bmyb* und *p107* in *E2f3*^{-/-} MEFs zu beobachten, welche nicht auf eine verminderte Expression von HELLS in *E2f3*^{-/-} MEFs zurückzuführen ist (Abb. 3.10B). Zudem war die Bindung von HELLS an das schon beschriebene HELLS-Zielgen *Hoxa7* in *E2f3*^{-/-} MEFs nicht vermindert, sogar tendenziell eher verstärkt. Wie in Abb. 3.10C zu sehen ist, handelt es sich bei *Hoxa7* nicht um ein E2F3-Zielgen, da E2F3 zwar an den beschriebenen E2F-Zielgenen *p107* und *Bmyb* nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch am *Hoxa7*-Gen. Diese Versuche zeigen, dass der Verlust von E2F3 zwar zu einer für E2F-Zielgene spezifischen verminderten Bindung von HELLS führt, jedoch dass die Abwesenheit von E2F3 nicht zu einem kompletten Verlust der HELLS-Rekrutierung führt.

A



B



C

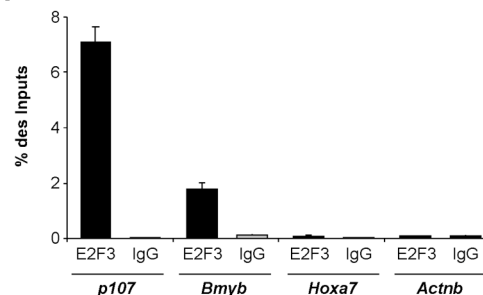


Abb. 3.10: Die Bindung von HELLs an die E2F-Zielgene *p107* und *Bmyb* ist in *E2f3*^{-/-} MEFs vermindert

A) Formaldehydfixiertes Chromatin von Wildtyp (Wt) oder *E2f3*^{-/-} MEFs wurde für eine ChIP mit einem HELLs-spezifischen Antikörper oder IgG eingesetzt und die angegebenen Promotoren amplifiziert. Der beta-Actin Promotor (*Actnb*) diente hier als Negativkontrolle und der *Hoxa7*-Promotor als E2F3-unabhängiges HELLs-Zielgen, während es sich bei *p107* und *Bmyb* um beschriebene E2F-Zielgene handelt (s. **C**). **B)** Die Expression von HELLs wurde in Wildtyp (Wt) MEFs oder *E2f3*^{-/-} MEFs untersucht. VINCULIN dient als Ladekontrolle. **C)** Chromatin von Wildtyp MEFs wurde mit einem E2F3-spezifischen Antikörper oder IgG (als Kontrolle) immunpräzipitiert um die Bindung von E2F3 an die Promotoren von *p107*, *Bmyb*, *Hoxa7* oder beta-Actin (*Actnb*) per qPCR zu untersuchen.

3.1.8 HELLs-Depletion in asynchron wachsenden Zellen führt zu keinem Effekt auf die Expression von E2F-Zielgenen

Um zu untersuchen welche Rolle HELLs bei der Regulation von E2F-regulierten Genen spielt, wurde HELLs mit Hilfe lentiviral transduzierter shRNAs in T98G Zellen depletiert. T98G Zellen wurden entweder mit einem Lentivirus infiziert, der eine shRNA in sich trug, die auf keine im humanem Genom befindliche Zielsequenz abzielt (shKontrl.) oder mit Lentiviren, die zwei verschiedene shRNA Sequenzen gegen humanes HELLs in sich trugen (shHells 1 oder shHells 2). Die Verwendung von zwei Sequenzen hat den Sinn so genannte *off target*-Effekte auszuschließen. Es kann vorkommen, dass die shRNA nicht ausschließlich zur Degradation der Ziel-RNA führt, sondern noch andere Ziele im Transkriptom hat, so dass

durch Verwendung von zwei unterschiedlichen shRNAs das Risiko vermindert wird, dass ein beobachteter Phänotyp aufgrund dieses *off target*-Effekts zustande kommt. Die beiden klonierten shRNAs führten zu einer effizienten Depletion (*knockdown*) von HELLS auf Protein- und RNA-Ebene (s. Abb. 3.11) in T98G Zellen.

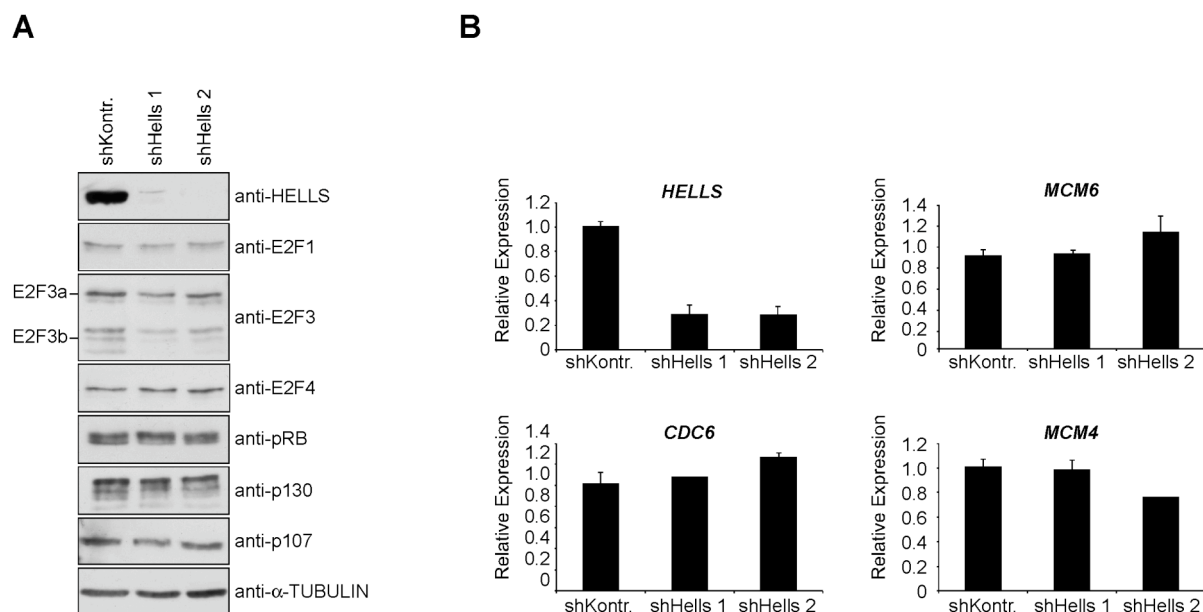


Abb. 3.11: Verlust von HELLS in asynchronen T98G Zellen hat keinen Effekt auf E2F-Zielgene

A) T98G Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die shRNAs gegen kein vorhergesagtes Ziel im humanem Genom haben (shKontr.) oder zwei verschiedene Sequenzen gegen *HELLS* (shHells 1 oder shHells 2) tragen. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und die Expression der angegebenen Proteine per Western Blot untersucht. α -TUBULIN dient hier als Ladekontrolle. **B)** Die Zellen wurden wie in **A)** behandelt und die Expression auf mRNA-Ebene per qRT-PCR quantifiziert. Es wurde gegen die Expression von *GAPDH* normalisiert. Die Werte der shKontr. Probe wurde als eins gesetzt und die Werte der beiden shHells Proben in Relation zu dieser Probe angegeben.

Zudem zeigte sich, dass auf Proteinebene weder ein nennenswerter Effekt auf die E2F-Zielgene E2F1 oder p107 noch die anderen *Pocket Proteine* pRB und p130 oder E2F4 zu beobachten war. Lediglich ein schwacher Verlust der E2F3a/b Expression war wiederholt nach *HELLS knockdown* zu beobachten. Dieser Effekt war allerdings nicht transkriptionell bedingt (s. Abb. 3.12). Auch auf mRNA-Ebene war die Expression der E2F-Zielgene *CDC6*, *MCM6* oder *MCM4* nicht nennenswert verändert (Abb. 3.11B).

3.1.9 HELLS ist essenziell für den Wiedereintritt in die S-Phase nach Quieszenz

Einer der Gründe, warum bei den folgenden Experimenten T98G Zellen verwendet wurden, war, dass diese Zellen sehr gut durch Serumentzug in die Quieszenz gebracht werden können und nach erneuter Zugabe von Serum synchron in die S-Phase gehen [45, 152, 157]. Hierbei ist zu erwähnen, dass asynchron wachsende Zellen aufgrund des vorhandenen Serums nie wirklich den quieszenten Zustand erreichen, jedoch lassen sich hier die stärksten Effekte bei *E2f3*^{-/-} MEFs beobachten [78], so dass für einen potenziellen Kofaktor von E2F3 dies auch zutreffen sollte. T98G Zellen wurden bereits in vielen Studien über E2F-Transkriptionsfaktoren verwendet [44, 45, 158] und sind somit ein gut untersuchtes Modellsystem für diese Zwecke. Zudem exprimieren diese Zellen weder funktionelles p53 noch p18^{INK4C} [159, 160] und haben zusätzlich einen Verlust des *INK4A/ARF* Lokus [161]. Aufgrund vorheriger Publikationen über *Hells*-defiziente MEFs hätte die mögliche Dysregulation dieser Zellzyklusinhibitoren nach HELLS-Verlust zur erschwerten Interpretation der Daten geführt (s. Kap. 1.11).

Die folgenden Experimente wurden durchgehend wie in Abb. 3.12A schematisch dargestellt, durchgeführt. Das Serum wurde immer direkt im Anschluss an die Infektion entzogen, um sekundäre Effekte möglichst zu vermeiden.

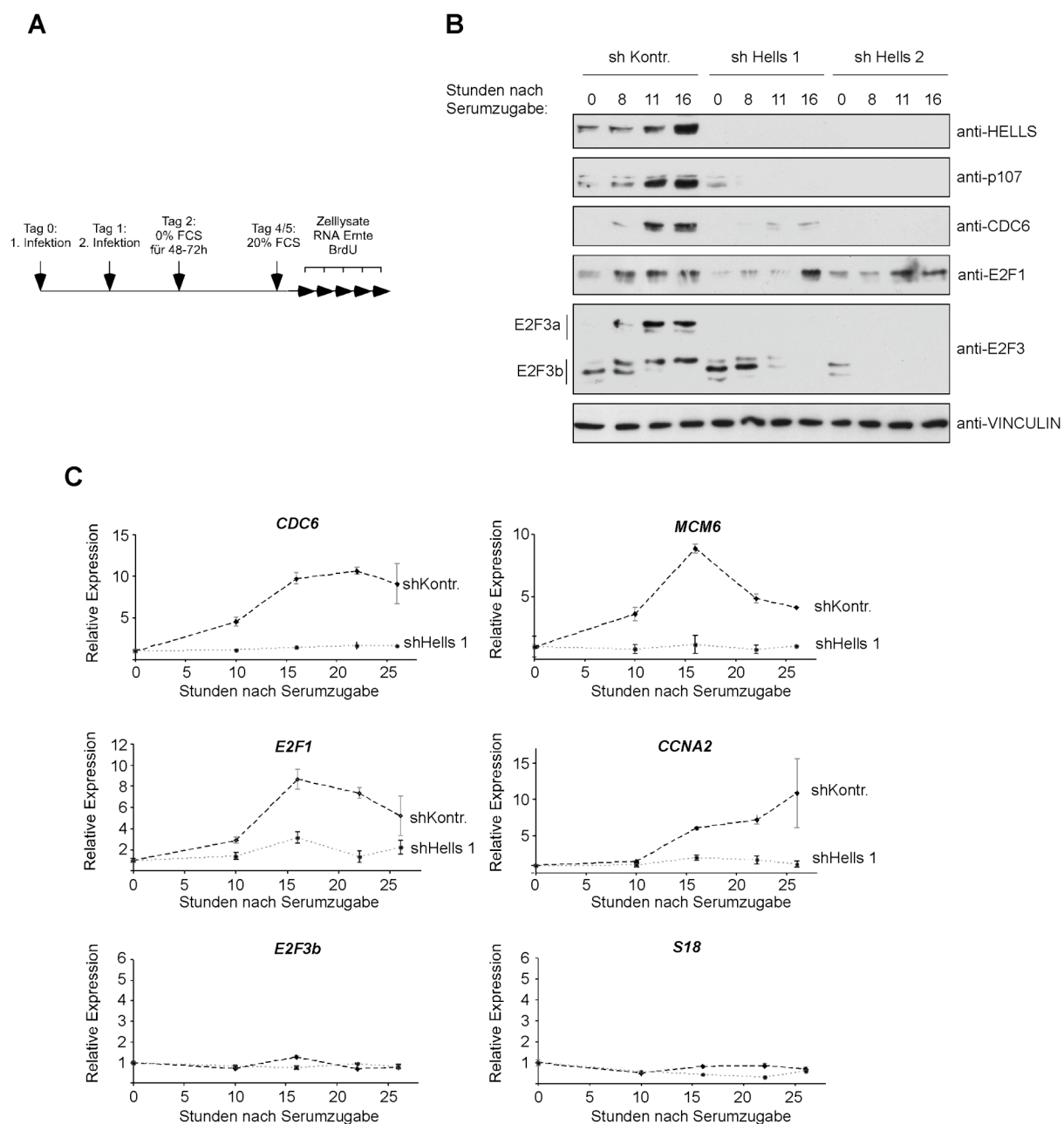


Abb. 3.12: HELLS ist essenziell für die Induktion von E2F-Zielgenen beim Austritt aus der Quieszenz

A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die Ergebnisse von **B)**-**C)**. **B)** Nach *knockdown* von HELLS in T98G Zellen wurden diese durch Serumentzug in G_0 arretiert, durch Zugabe von Serum wieder induziert und zu verschiedenen Zeiten nach Induktion Proteinlysate hergestellt. Per Western Blot wurde die Induktion von HELLS, p107, CDC6, E2F1 und E2F3a/b überprüft. VINCULIN dient hier als Ladekontrolle. **C)** Die angegebenen Gene wurden per qRT-PCR untersucht. Hierfür wurde gegen die *GAPDH* Expression normalisiert, der Zeitpunkt null Stunden nach Induktion als eins gesetzt und die anderen Werte in Relation dazu angegeben. Angegeben ist der MW \pm SD. *S18*, als weiteres nicht zellzyklusreguliertes Gen, diente als zusätzliche Kontrolle.

In Übereinstimmung mit einer vorigen Studie [162] konnte eine Induktion von HELLS nach Serumstimulation beobachtet werden. Zudem konnte wie erwartet eine Induktion der E2F-Zielgene p107, CDC6, E2F1 und E2F3a bei kontrollinfizierten Zellen (shKontr.) auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 3.12B). Hier war jedoch ein drastischer Unterschied zu den Resultaten bei asynchron wachsenden Zellen zu beobachten: in beiden HELLS-depletierten Zelllinien waren p107, CDC6 und E2F3a fast gar nicht mehr detektierbar und E2F1 wurde sehr viel später aktiviert als in der Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung auf mRNA-Ebene für die untersuchten E2F-Zielgene *CDC6*, *MCM6*, *E2F1* und *CCNA2* (Abb. 3.12C). Die veränderte Expression war spezifisch für E2F-Zielgene, da sich weder bei *E2F3b* noch bei *S18* eine wesentliche Veränderung der Expression zwischen shHells 1-infizierten und kontrollinfizierten Zellen zeigte. Wie schon erwähnt, zeigte E2F3b auch hier eine stark verminderte Expression auf Proteinebene (Abb. 3.12B), welche jedoch nicht transkriptionell bedingt ist (Abb. 3.12C) und somit wahrscheinlich auf eine verminderte Stabilität von E2F3b zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass HELLS essenziell für die transkriptionelle Aktivierung von E2F-Zielgenen beim Austritt aus der G₀-Phase des Zellzyklus ist.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen führte die verminderte Expression von HELLS auch zu einem verspäteten Wiedereintritt von T98G Zellen in die S-Phase nach Serumzug, wie durch ein BrdU-Inkorporationsexperiment gezeigt werden konnte (3.13 A-B). Hier war zu beobachten, dass die Zellen nach HELLS-Depletion sehr viel langsamer in die S-Phase eintraten, so dass die HELLS-depletierten Zellen erst nach 24 Stunden zu 50 % BrdU-positiv waren, was bei kontrollinfizierten Zellen bereits nach 14 Stunden der Fall war. Um zu überprüfen, ob in den HELLS-depletierten Zellen womöglich ein Defekt oberhalb der seruminduzierten pRB-Phosphorylierung vorlag, wurde sowohl die Cyclin D1-Induktion als auch die pRB-Phosphorylierung an Serin 780 in T98G Zellen untersucht (Abb. 3.13C). Bei dieser Phosphorylierungsstelle handelt es sich um ein Serin, dass spezifisch von Cyclin D1-CDK4/6 Kinasen phosphoryliert wird [163] und demzufolge diese Phosphorylierung in *Cyclin D1* Knockoutmäusen nicht mehr nachweisbar ist [164]. Zum einen war die seruminduzierte Akkumulation von Cyclin D1 in HELLS-depletierten Zellen nicht verändert und zum anderen war auch die Phosphorylierung von pRB an Serin 780 durch die HELLS-Depletion bis 11 Stunden nach Seruminduktion nicht vermindert. Nach 16 Stunden ist zwar eine verminderte Phosphorylierung von pRB in den HELLS-depletierten Zellen zu beobachten, jedoch ist dieser Effekt auf eine verminderte Expression von pRB selbst zurückzuführen. Dies kann mit der Tatsache erklärt werden, dass pRB ein direktes E2F-Zielgen ist [98] und somit vermutlich durch die verminderte HELLS-Expression genauso wie die anderen untersuchten E2F-Zielgene nicht mehr aktiviert wird. Allerdings sind nach 11 Stunden (hier ist die Phosphorylie-

rung zwischen HELLS-depletierten und kontrollinfizierten Zellen noch gleich) schon deutliche Unterschiede in der CDC6-Induktion zwischen beiden Zellpopulationen zu beobachten (s. auch Abb. 3.12C). Aufgrund dessen lässt sich schlussfolgern, dass die verminderte Induktion von E2F-Zielgenen nicht auf einen Defekt oberhalb der pRB-Phosphorylierung zurückgeführt werden kann.

Der in Abb. 3.13B gezeigte, verlangsamte Eintritt in die S-Phase nach HELLS-Depletion erklärt somit auch die verminderte Wachstumsrate von NIH3T3 Zellen, in denen HELLS mittels retroviraler shRNAs herunterreguliert wurde (Abb. 3.13 D-F). Die verwendeten shRNAs führten zu einer effizienten Depletion von HELLS (Abb. 3.13 D). Das Wachstum war sowohl unter Bedingungen geringer Zelldichte bei einem Kolonienformationsexperiment (Abb. 3.13E), als auch unter Bedingungen hoher Zelldichte bei einer kumulativen Wachstumskurve (Abb. 3.13F) in den HELLS-depletierten Zellen stark vermindert.

Bei Untersuchungen der Apoptoserate konnten keine Unterschiede zwischen HELLS-depletierten und kontrollinfizierten Zellen festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt), so dass die verminderte Proliferationsrate durch den Defekt beim S-Phaseeintritt erklärt werden kann. Ein Grund, warum hier zusätzlich NIH3T3 Zellen verwendet wurden, war, dass in diesem Zelltyp nach HELLS-Depletion kein Verlust der genomweiten DNA-Methylierung beobachtet werden konnte [142] , so dass dies als Grund für die beobachteten Effekte zusätzlich ausgeschlossen werden kann.

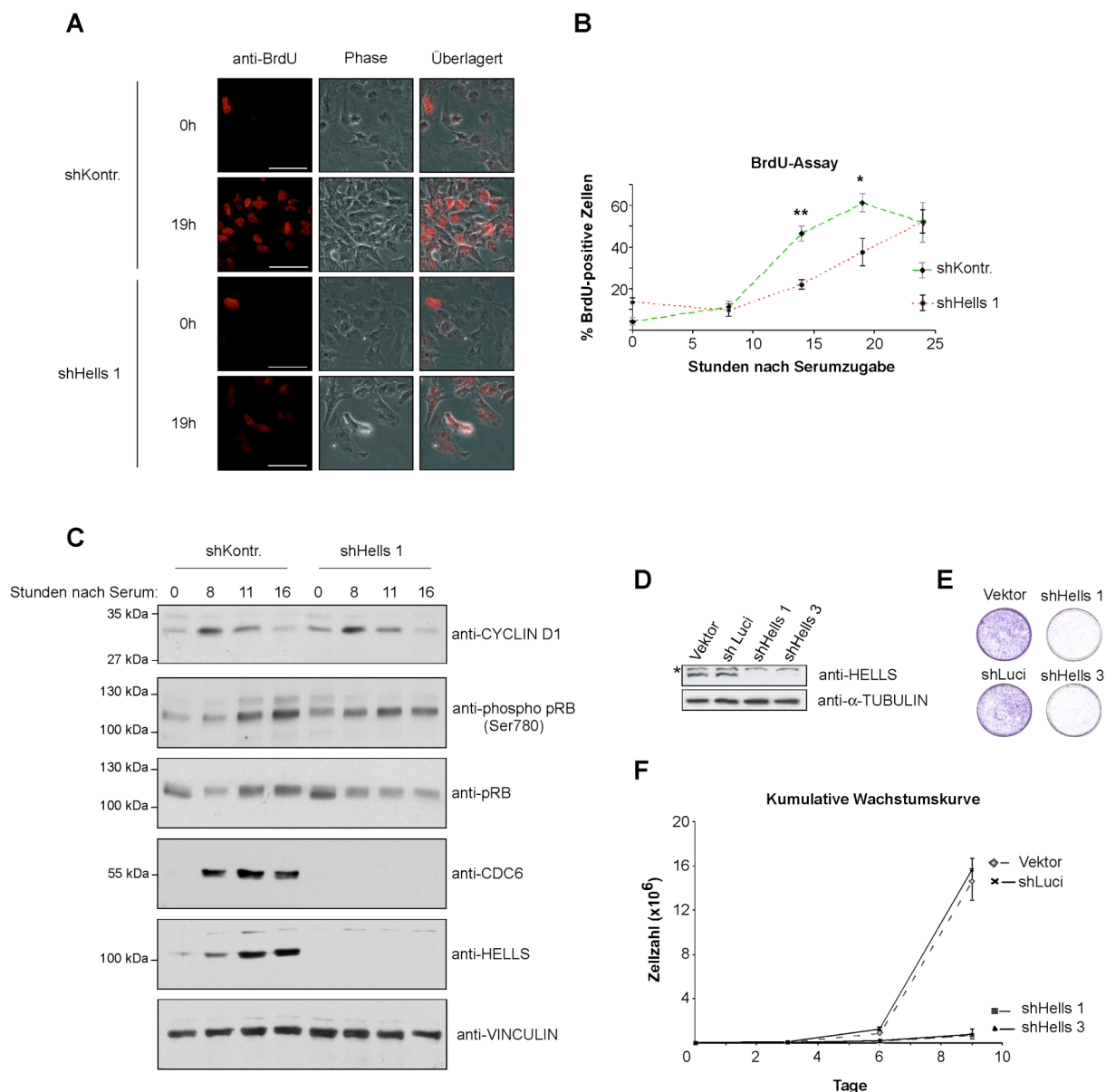


Abb. 3.13: Der Verlust von HELLS führt zu einem verzögerten Wiedereintritt in die S-Phase und einem Proliferationsdefekt

A) Das Experiment wurde mit T98G Zellen wie in Abb. 3.12 durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 50 μ M BrdU inkubiert und BrdU-positive Zellen anschließend per Immunfluoreszenz identifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel für die Zeitpunkte 0h und 19h nach Serumzugabe. **B)** Quantifizierung von drei unabhängigen BrdU-Experimenten. Pro Zeitpunkt wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen quantifiziert. Pro Zeitpunkt wurden je mindestens 200 Zellen gezählt. Angegeben ist der MW \pm SE (Standardfehler). * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,01 (T-Test nach Fisher) **C)** T98G Zellen wurden wie in Abb. 3.12A behandelt und die Expression von den angegebenen Proteinen per Western Blot untersucht. **D)** Knockdown von HELLS in NIH3T3 Zellen. TUBULIN diente hier als Ladekontrolle und eine unspezifische Bande ist mit einem Stern gekennzeichnet. **E)** 1×10^5 NIH3T3 Zellen wurden nach der Infektion auf eine 10 cm-Schale ausplattiert und nach 8 Tagen mit Kristallviolett gefärbt. **F)** Am Tag 0 wurden 8×10^5 NIH3T3 Zellen pro 6-Lochplatte ausplattiert, jeweils nach drei Tagen die Zellzahl bestimmt und daraufhin erneut 8×10^5 Zellen ausplattiert. Hieraus wurde die kumulative Wachstumskurve errechnet. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt und angegeben ist der MW \pm SD.

3.1.10 E2F3 benötigt HELLS zur Aktivierung seiner Zielgene

In den vorigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass E2F-Zielgene bei dem Wiedereintritt in den Zellzyklus nach shRNA-vermittelter Depletion von HELLS nicht mehr aktiviert werden können. Die Interpretation dieser Ergebnisse wird allerdings dadurch erschwert, dass die Depletion von HELLS ebenfalls zu einer verminderten E2F3-Menge auf Proteinebene führt (Abb. 3.12B). Somit wäre es denkbar, dass allein die verminderte E2F3-Expression der Grund für die fehlende Induktion der Zielgene ist. Um diese Frage zu klären, wurde auch hier das HA-ER-E2F3a System verwendet. Es wurde schon in vorigen Studien gezeigt, dass das HA-ER-E2F3a Fusionsprotein ein potenter Aktivator von E2F-Zielgenen ist [93, 165, 166] und dass alleine die Aktivierung dieses Proteins auch in Abwesenheit von Serum ausreicht, um Zellen aus der Quieszenz in die S-Phase zu bringen [153]. Somit ermöglicht dieses System zum einen den Verlust von E2F3 nach HELLS-Depletion zu kompensieren und zum anderen die Induktion von Zielgenen unabhängig von anderen beeinflussenden Faktoren zu untersuchen. Hierfür wurde das Experiment im Wesentlichen wie in Abb. 3.12A durchgeführt. Der einzige Unterschied war, dass hier T98G-HA-ER-E2F3a Zellen verwendet wurden, die zusätzlich zum Serum noch mit OHT induziert wurden, um das HA-ER-E2F3a in den Zellkern zu bringen. Dabei waren trotz starker Überexpression des HA-ER-E2F3a Proteins (s. Abb. 3.9A) die untersuchten Zielgene *p107*, *CDC6* und *E2F1* nach HELLS-Depletion immer noch nicht induzierbar (Abb. 3.14A). Die fehlende Induktion der E2F-Zielgene nach HELLS-Depletion kann allerdings weder mit einer gestörten Translokation des HA-ER-E2F3a Proteins in den Zellkern (Abb. 3.14B), noch mit einer gestörten Bindung von HA-ER-E2F3a an seine Zielgene erklärt werden. Im ChIP-Experiment war E2F3 in den HELLS-depletierten Zellen nach OHT-Induktion mindestens genauso, wenn nicht sogar etwas stärker, an den untersuchten Promotoren der E2F-Zielgene *p107*, *MCM4*, *CDC6* oder *PCNA* detektierbar wie in den kontrollinfizierten Zellen (Abb. 3.14C).

Dies beweist, dass die E2F3a-Transaktivierungseigenschaften von der HELLS-Expression abhängen und dass E2F3a seine Zielgene in Abwesenheit von HELLS nicht mehr aktivieren kann.

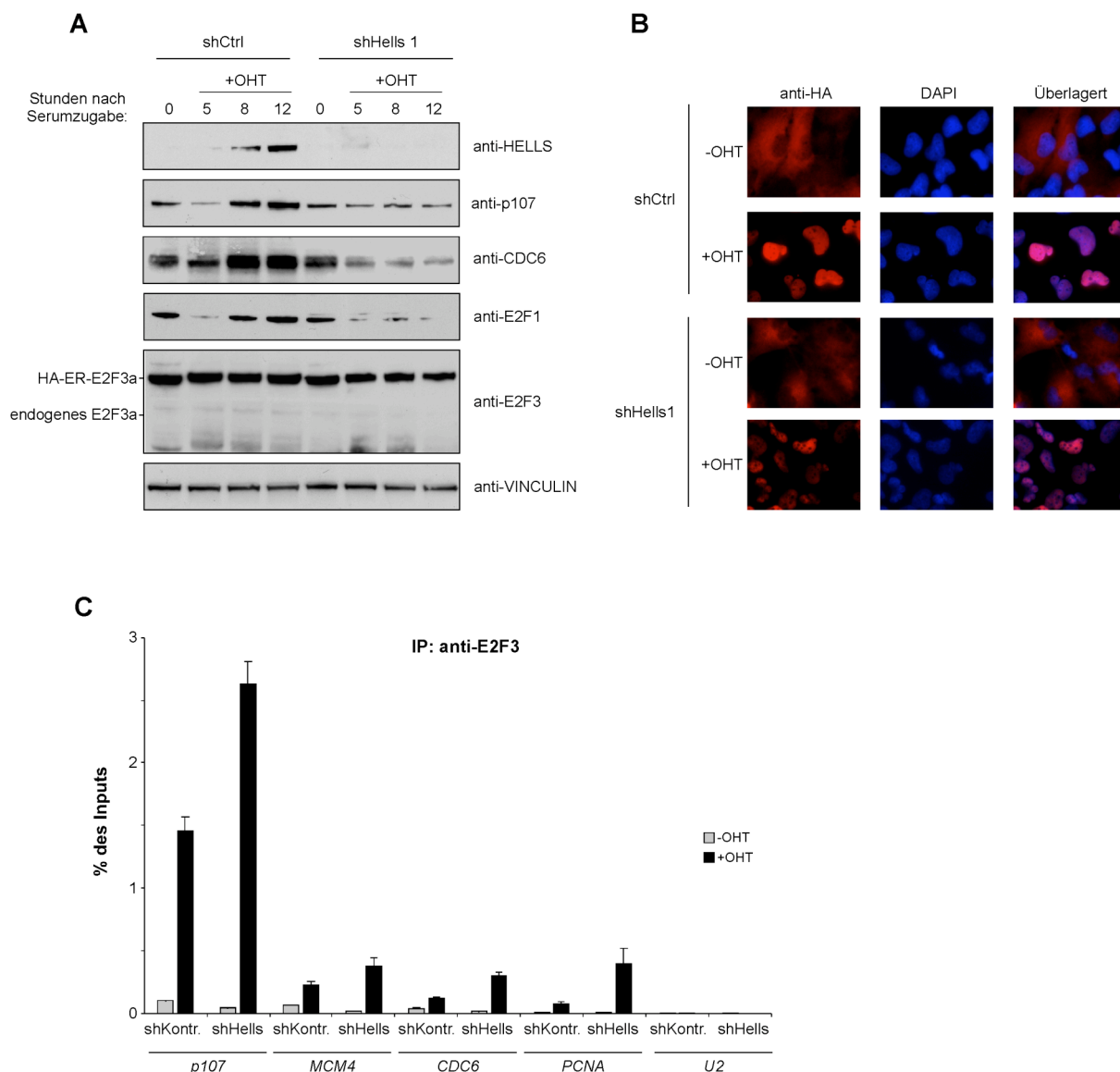


Abb. 3.14 : Überexpression von E2F3a führt in Abwesenheit von HELLS zu keiner Induktion seiner Zielgene

A) Das Experiment wurde wie in Abb. 3.12A durchgeführt. Die Zellen wurden jedoch zusätzlich zum Serum mit 300 nM OHT induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion geerntet. Per Western Blot wurden die Expression der E2F-Zielgene p107, CDC6 und E2F1 untersucht. Zudem wurde die Expression des HA-ER-E2F3a Proteins untersucht. Die Laufhöhe von endogenem E2F3a ist angegeben, ist aber genauso wie E2F3b aufgrund der starken Überexpression des Fusionsproteins und dessen Degradationsbanden nicht detektierbar. VINCULIN dient hier als Ladekontrolle **B)** Die Zellen wurden vor (-OHT) oder eine Stunde nach der Serum/OHT-Induktion für die Immunfluoreszenz prozessiert. Das HA-ER-E2F3a Protein wurde mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop (anti-HA) nachgewiesen und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. **C)** Die Zellen wurden wie in **B)** behandelt und 8 Stunden nach der Serum/OHT-Induktion eine ChIP gegen E2F3 durchgeführt. Hier wurde die Bindung von E2F3 an die Promotoren der E2F-Zielgene *p107*, *MCM4*, *CDC6* und *PCNA* per qPCR untersucht. Der *U2* Promotor dient als Negativkontrolle. Die qPCR wurde in Triplikaten durchgeführt und der MW \pm SD ist angegeben.

3.1.11 HELLS ist selbst ein direktes E2F-Zielgen

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente (Abb. 3.12) zeigten, dass HELLS nach Seruminduktion verstärkt exprimiert wurde. Dies legte die Vermutung nahe, dass *HELLS* selbst ein direktes E2F-Zielgen sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst die Expressionlevel von HELLS in *Rb*^{-/-} MEFs mit Wildtyp MEFs auf RNA-Ebene (Abb. 3.15A) und Proteinebene (Abb. 3.15B) verglichen. Sehr oft sind E2F-regulierte Gene in *Rb*^{-/-} MEFs hochreguliert [167], da durch den Verlust dieses Repressors, die aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren nicht mehr antagonisiert werden und diese somit verstärkt ihre Zielgene aktivieren. Hierbei konnte festgestellt werden, dass HELLS sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in einer ähnlichen Art und Weise wie das E2F-Zielgen *p107* de-reprimiert war. Zudem zeigte die *Hells*-Induktion in synchronisierten NIH3T3 Zellen eine ähnliche Kinetik wie das bekannte E2F-Zielgen *Mcm3* (Abb. 3.15C). Bei der *in silico* Analyse des *Hells*-Promotors konnten zwei potenzielle E2F-Bindestellen identifiziert werden, welche zwischen Maus und Mensch konserviert sind (Abb. 3.15D). Um zu überprüfen, ob *Hells* ein direktes E2F-Zielgen ist, wurden ChIP-Experimente mit Chromatin aus asynchron wachsenden MEFs für E2F1, E2F3 und E2F4 durchgeführt. Hierbei konnten E2F1, E2F3 und E2F4 am *Hells*-Promotor mit einer ähnlich starken Bindung wie an dem Promotor des bekannten E2F-Zielgens *Bmyb* [168] detektiert werden. Dies zeigt, dass die Expression von HELLS selbst während des Zellzyklus durch den E2F/pRB Signalweg reguliert wird.

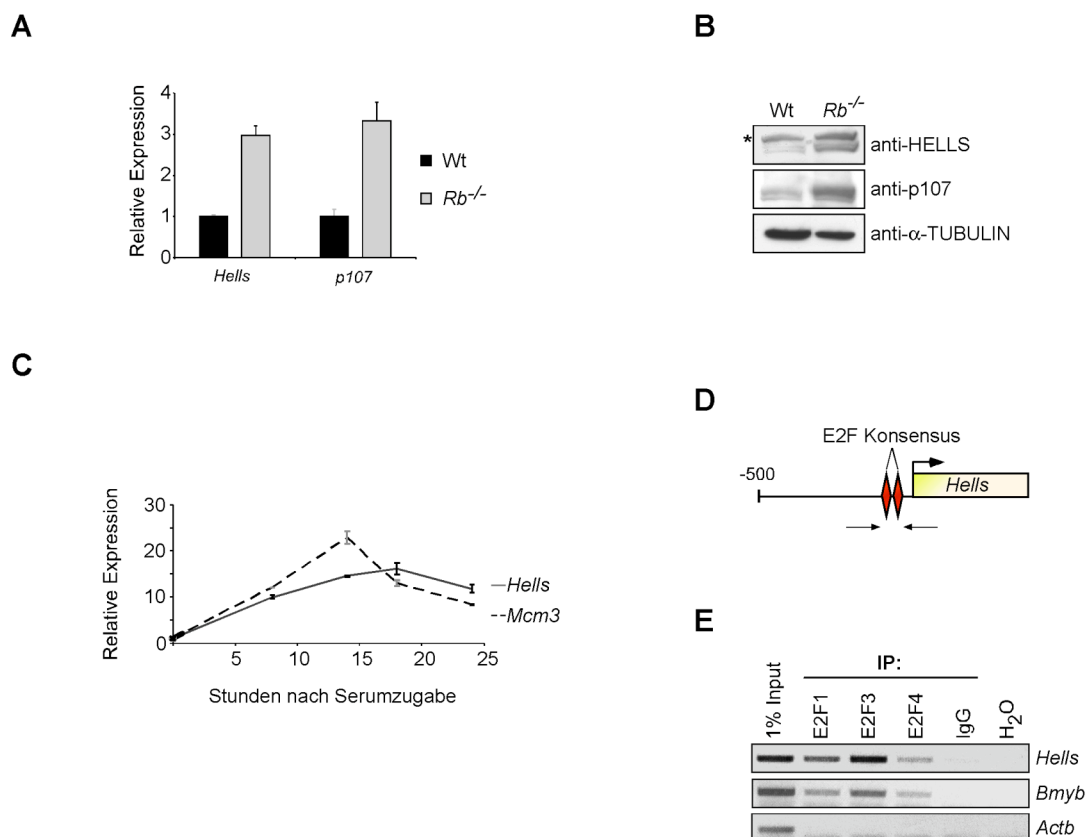


Abb. 3.15: *Hells* ist ein direktes E2F-Zielgen

A-B) Die Expression von *Hells* wurde in Wildtyp (Wt) MEFs und *Rb*^{-/-} MEFs per qRT-PCR (**A**) oder Western Blot (**B**) untersucht. Bei der qRT-PCR wurde die Expression in Wt MEFs jeweils als eins gesetzt. *p107* diente jeweils als Positivkontrolle und angegeben ist der MW \pm SD. Eine unspezifische Bande ist mit einem Stern gekennzeichnet **C)** Die Expression von *Hells* und *Mcm3* wurde in synchronisierten NIH3T3 Zellen per qRT-PCR bestimmt. Die NIH3T3 Zellen wurden für 48 h in 0.1% Serum kultiviert, anschließend durch Serumzugabe stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten die RNA isoliert. Angegeben ist der MW \pm SD **D)** Schematische Darstellung des murinen *Hells* Promotors. Potenzielle E2F-Bindestellen sind als rote Rauten und die Lage der Primer als Pfeile dargestellt. **E)** ChIP-Experiment von asynchron wachsenden Wt MEFs. Das Chromatin wurde mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert, um die Bindung von E2F1, E2F3 und E2F4 an den *Hells* Promotor zu untersuchen. Der *Bmyb* Promotor diente als Positiv- und der *Actb* Promotor als Negativkontrolle.

3.1.12 HELLS und E2F3 sind in aggressiven Prostatakarzinomen hochreguliert

In vorigen Studien wurde schon gezeigt, dass E2F3 in verschiedenen humanen Tumoren, wie z. B. bei verschiedenen Arten des Lungenkrebses [169] oder im Harnblasenkarzinom [33, 34, 170] überexprimiert ist. Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel ist das Prostatakarzinom. Für diese Tumorart konnte bei fast 70 % der Fälle eine Überexpression von E2F3 de-

tektiert werden [145] . Außerdem konnte in dieser Veröffentlichung die Stärke der E2F3-Überexpression direkt mit der Überlebensrate der untersuchten Patienten korreliert werden, so dass eine starke E2F3-Expression gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose für den Patienten ist. Um die Expression von HELLS und E2F3 in humanen Tumoren zu untersuchen, wurden 47 Prostata-Biopsien von unterschiedlichen Patienten per Immunhistochemie untersucht (in Kooperation mit Prof. Christoph Loddenkemper, Charité Berlin). Hierfür wurden die Biopsien als *tissue microarrays* (TMAs) ausgestanzt und mit Antikörpern gegen E2F3 oder HELLS gefärbt (Abb. 3.16A). Zusätzlich wurde für jeden Fall der *Gleason score* bestimmt. Dieser setzt nach pathologischen Kriterien die Malignität des Prostatakarzinoms fest. Hier ist ein niedriger *Gleason score* (1-3) gleichbedeutend mit geringer Aggressivität und besserer Prognose für den Patienten, während ein hoher *Gleason score* (4-5) mit hoher Aggressivität und schlechter Prognose für den Patienten einhergeht. Der so genannte *Major Gleason score* wird von 1 (für wenig aggressiv, gut differenziert) bis 5 (hochaggressiv, schlecht differenziert) vergeben. Hieraus errechnet sich anschließend der *Gleason score*. Dabei wird derjenige Typ (1-5) bestimmt, der am häufigsten ist (z. B. 5) und addiert sich zu dem Typen, der am zweithäufigsten auf dem Schnitt zu beobachten ist (z. B. 4), was dann einen *Gleason score* von $4+5=9$ ergäbe. Der *Gleason score* von 7 wird in 7a und 7b unterteilt, wobei 7a einem *Gleason score* von $3+4$ entspricht und 7b wiederum einem *Gleason score* von $4+3$. Somit ist 7b der aggressivere, weil der wenig differenzierte *Major Gleason score* 4 überwiegt und somit auch eine schlechtere Prognose für den Patienten darstellt. In unseren Analysen konnten auch wir eine signifikante Korrelation zwischen starker E2F3-Expression und hohem *Gleason score* feststellen (Abb. 3.16B). Bei dieser Analyse zeigten nur 2 (6%) von 30 Tumoren mit einem *Gleason score* zwischen 5 und 7a eine moderate bis starke Färbung für E2F3. Für die aggressiveren Tumore mit einem *Gleason score* von 7b bis 9 zeigten hingegen 13 (76%) von 17 Tumore eine moderate bis starke E2F3-Färbung. Die gleiche signifikante Korrelation war auch für HELLS zu beobachten, so dass aggressivere Tumore tendenziell auch eine hohe HELLS-Expression aufwiesen (Abb. 3.16C). Hier zeigte nur einer (3%) der weniger aggressiven Tumore eine moderate bis starke Färbung für HELLS, während bei 7 (41%) von 17 Tumoren mit einem höheren *Gleason score* auch eine moderate bis starke HELLS-Färbung nachweisbar war. Zusätzlich ließ sich hier auch eine signifikante Korrelation zwischen der Stärke der E2F3 Expression und der HELLS-Expression innerhalb eines Tumorschnitts beobachten (Abb. 3.16D), was konsistent mit der Beobachtung ist, dass *HELLS* selbst ein E2F-Zielgen ist (Abb. 3.15).

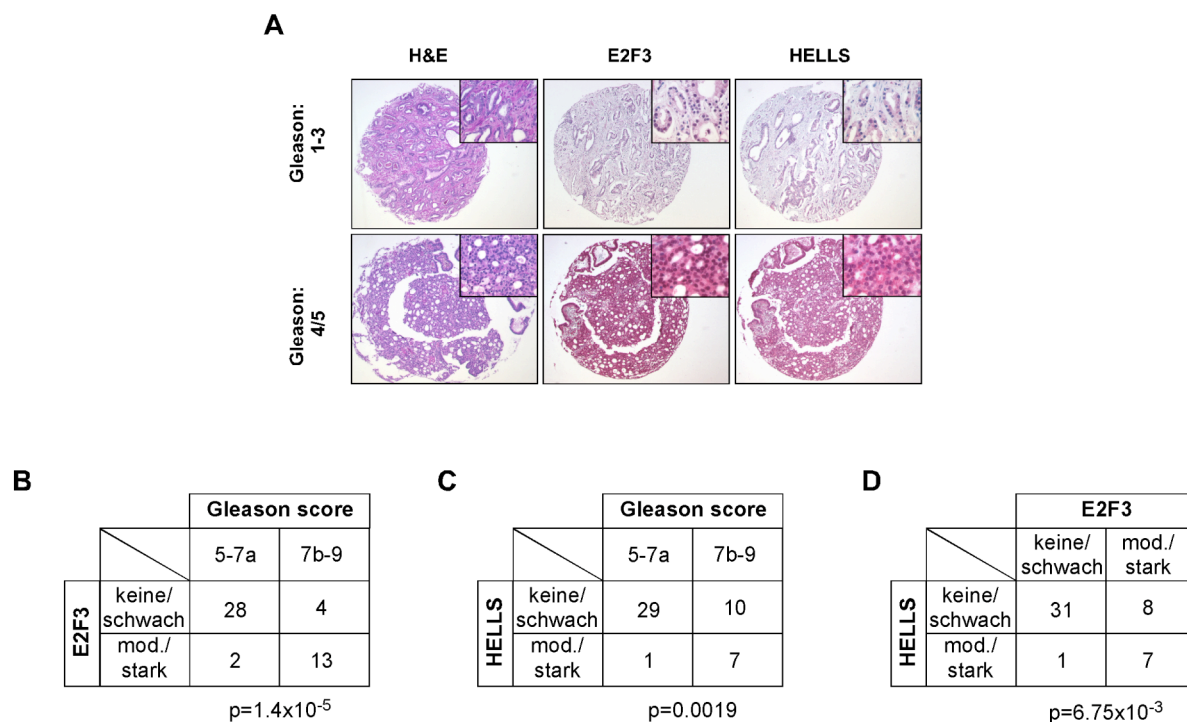


Abb. 3.16: Die Expression von HELLS und E2F3 korreliert mit der Malignität von Prostatakarzinomen

A) Repräsentative Beispiele der *tissue microarrays*. Die Schnitte wurden entweder mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (H&E). E2F3 oder HELLS wurden per Immunhistochemie nachgewiesen. **B-D)** Zusammenfassung aller 47 Tumorbiospien und deren Korrelation zwischen *Gleason score* und Stärke der E2F3-Expression (**B**) oder HELLS-Expression (**C**) und deren Korrelation ihrer Expression untereinander (**D**). Der p-Wert wurde mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher ermittelt.

3.2 Identifizierung neuer E2F3-Zielgene per ChIP-Seq

3.2.1 Identifizierung neuer proteinkodierender E2F3-Zielgene

Die Ergebnisse der ChIP-Experimente für HELLS und E2F3 (Abb. 3.7-3.10) zeigen, dass HELLS an den hier untersuchten E2F-Zielgenen nachgewiesen werden kann. Um die genomweite Bindung von E2F3 und HELLS und den potenziellen Überlapp dieser Bindungen zu bestimmen, wurde ein ChIP-Seq Experiment für E2F3 und HELLS durchgeführt. Leider war die Anreicherung von HELLS zu schwach, um statistisch signifikante Bindestellen ermitteln zu können, doch für E2F3 konnte eine Vielzahl von Bindestellen im humanen Genom ermittelt werden. Da sich unter den ermittelten Bindestellen eine Vielzahl neuer potenzieller E2F3-Zielgene befindet, sollen die Ergebnisse für E2F3 hier kurz dargestellt und diskutiert werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnten per *ChIP-on-Chip*-Studien bis heute viele neue E2F-Zielgene identifiziert werden. Diese Technologie unterliegt jedoch einigen technischen Limitierungen. Bei der *ChIP-on-Chip*-Technologie werden meist nur bekannte Promotoren als Sonde gespottet, so dass die Entdeckung neuer Promotoren von vorne herein dadurch limitiert ist, was jeweils als Sonde verwendet wurde. Eine genomweite Abdeckung ist allerdings bis jetzt nur für relativ kleine Genome wie *Drosophila melanogaster* oder Hefe sowie kleine menschliche Chromosomen, wie z.B. Chromosom 21, möglich. Ein weiteres Problem ist, dass die Detektionsmethoden jeweils Hybridisierungsschritte beinhalten, was eine lineare quantitative Auswertung der Resultate unmöglich macht. Eine neue Technologie, die diese Probleme umgeht, ist die ChIP-Seq Technologie. Hier wird die ChIP mit der so genannten *deep sequencing* Technologie gekoppelt. Diese Technologie ermöglicht es, mehrere Millionen Sequenzierungen von kurzen (ca. 18-25 Basenpaaren) DNA-Fragmenten in nur wenigen Tagen durchzuführen. Somit werden nach einer ChIP gegen einen Transkriptionsfaktor solche Regionen, an welche dieser gebunden war, häufiger sequenziert, als ungebundene Regionen des Genoms. Hieraus können anschließend durch bioinformatische und statistische Analysen die Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors errechnet werden. Dabei sind die Anzahl der Sequenzierungen nahezu linear zu der relativen Anreicherung in einer normalen ChIP, so dass die Ergebnisse sehr quantitativ sind [171] .

Um neue E2F3-regulierte Promotoren zu identifizieren, wurde ein ChIP-Seq Experiment für E2F3 in HCT116 Zellen durchgeführt. Hierfür wurde Chromatin von asynchron wachsenden HCT116 Zellen mit einem E2F3-spezifischen Antikörper oder einer IgG-Kontrolle immunpräzipitiert und die DNA nach Ligation von Adaptern, welche zur Amplifikation der DNA und zur

anschließenden Sequenzierung genutzt werden, in der so genannten *Flow Cell* amplifiziert. Hier wird je ein DNA-Molekül an eine bestimmte Region über die Adapter auf der *Flow Cell* gebunden und dann auf dieser durch Brückenamplifikation vermehrt, so dass ca. tausend identische DNA-Moleküle (welche als ein *Cluster* bezeichnet werden) an dieser Stelle generiert werden. Die *Flow Cell* mit den generierten *Clustern* wird anschließend in einer Solexa 1G Maschine sequenziert. Bei diesem Versuch wurden für E2F3 und IgG je über 20 Millionen Sequenzen identifiziert, von denen 8.56 % (für E2F3) beziehungsweise 6.15 % (für IgG) eindeutig einer Sequenz im humanen Genom zugeordnet werden konnten (Abb. 3.17A).

Nach der bioinformatischen Analyse (freundlicherweise durchgeführt von Jonas Maaskola aus dem Labor von Prof. Nikolaus Rajewsky) konnten hiermit 2690 Gene (mit einem p-Wert von 10^{-25}) als E2F3-Zielgene identifiziert werden (s. Anhang). Verglichen mit publizierten *ChIP-on-Chip*-Studien über E2F-Transkriptionsfaktoren [98, 100], ist hier die Anzahl der Zielgene um den Faktor zwei bis drei höher, was zeigt, dass hiermit eine große Anzahl von neuen potenziellen E2F3-Zielgenen identifiziert werden konnte.

A

	E2F3	IgG
Sequenzierungen gesamt	24 217 142	22 215 233
gemappte Sequenzierungen	2 074 177	1 576 704
% gemappter Sequenzierungen	8.56 %	6.15 %

B

Abb. 3.17: E2F3-angereicherte Regionen auf Chromosom 8

A) Zusammenfassung der Sequenzierungsdaten für E2F3 und der IgG-Kontrolle. **B)** Dargestellt sind alle E2F3-gebundenen Regionen (als rote Balken) auf dem Chromosom 8. In grün sind annotierten Transkripte dargestellt. In der unteren Darstellung ist eine Vergrößerung des oberen Graphs am Transkriptionsstart des bekannten E2F-Zielgen *MYC* dargestellt.

Ein Vorteil der ChIP-Seq Technologie ist seine sehr gute Auflösung, was in Abb. 3.17B verdeutlicht wird. Hier sind exemplarisch die E2F3-gebundenen Regionen auf Chromosom 8 und zusätzlich die E2F3-angereicherte Region im bekannten E2F-Zielgen *MYC* dargestellt. Hier lässt sich gut erkennen, dass sich die E2F3-angereicherte Region über eine Region von weniger als 100 bp im *MYC*-Promotor erstreckt.

Um die relative Position der E2F3-Bindestellen zum Transkriptionsstart (TSS) zu ermitteln, wurde in Abb. 3.18 der Abstand aller E2F3-angereicherten Regionen zum nächstgelegenen TSS dargestellt. Hierbei konnte experimentell bestätigt werden, was schon per bioinformatischer Analyse vorhergesagt wurde [172], nämlich dass E2F-Bindestellen besonders häufig in einem Fenster von 300 bp um den TSS zu finden sind.

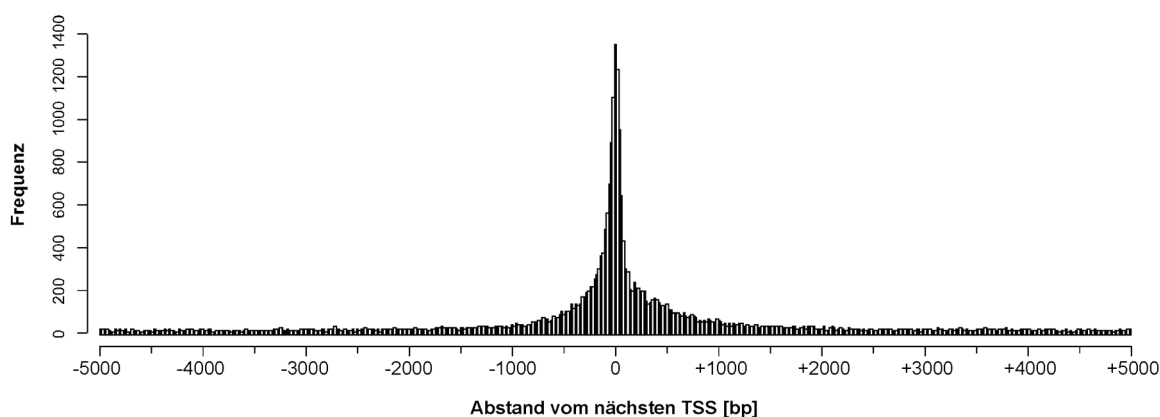


Abb. 3.18: E2F3 bindet nahe des Transkriptionsstarts

Alle identifizierten E2F3-Bindestellen wurden in der Abhängigkeit von der Distanz (in 50 bp-Fenstern) des nächst gelegenen Transkriptionsstarts (TSS) dargestellt.

3.2.2 Identifizierung von E2F3-regulierten miRNA-Promotoren

Wie schon erwähnt, ist man durch die ChIP-Seq Technologie nicht auf bekannte Promotoren beschränkt, weshalb die Daten dieses Experiments auch genutzt wurden, um potenzielle miRNA-Promotoren zu identifizieren, die durch E2F3 reguliert werden könnten. Bis jetzt sind schon einige miRNAs beschrieben, deren Expression direkt durch E2F3 reguliert werden [99, 173]. Diese identifizierten miRNAs liegen alle als so genanntes *Cluster* (miR-17-92 *Cluster*) in einem Primärtranskript vor und werden somit von einem gemeinsamen Promotor angetrieben, der von E2F3 aktiviert wird.

Problematisch bei der Identifizierung von miRNA-Promotoren ist deren zum Teil sehr großer Abstand zu der Sequenz der reifen miRNA. So können die Promotoren für die primären Transkripte der miRNA mehrere Kilobasen von der reifen miRNA entfernt liegen [174], wodurch es schwierig ist, eine Bindungsstelle von E2F3 einem miRNA-Promotor zuzuordnen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Daten des E2F3 ChIP-Seq Experiments mit den Daten einer anderen publizierten Studie verglichen [175]. In dieser Publikation wurden per ChIP-Seq solche miRNA-Gene identifiziert, die von den Pluripotenzfaktoren OCT4, SOX2, NANOG und TCF3 in humanen embryonalen Stammzellen reguliert wurden. Um sicherzugehen, dass es sich bei den identifizierten Bindestellen tatsächlich um Promotoren handelt, wurde zusätzlich ChIP-Seq-Experimente für die Trimethylierung von Lysin 4 an Histon 3 (H3K4me3) und K3K36me3 durchgeführt. H3K4me3 findet sich fast ausschließlich in der Promotorregion von Genen [176], während H3K36me3 sich innerhalb eines transkribierten Gens findet [177]. Somit ist eine Kombination dieser beiden Histonmodifikationen gut geeignet um Primärtranskripte und deren Promotoren zu identifizieren. Durch den Vergleich mit dieser Studie konnten 100 potenzielle miRNA-Promotoren identifiziert werden, bei denen die ermittelte E2F3-Bindestelle in einem Abstand von nicht mehr als 300 bp vom TSS entfernt lag (s. Anhang). Bis jetzt ist nur das miR-17-92 *Cluster* als direktes Ziel von E2F3 beschrieben. Dieses konnte mit der beschriebenen Methode auch identifiziert werden, was nahe legt, dass diese Analyse in der Tat geeignet ist, um E2F3-regulierte miRNA-Promotoren zu finden.

3.2.3 E2F3 bindet an die Promotoren von Regulatoren der miRNA-Biogenese

Bei der Analyse der per ChIP-Seq identifizierten Gene war auffällig, dass E2F3 an diverse Promotoren von Genen bindet, welche für Proteine der miRNA-Biogenese kodieren. In unabhängigen Experimenten konnten *DGCR8*, *EXP5* und *RHA* als direkte E2F3-Zielgene bestätigt werden (s. Abb. 3.19A), so dass somit der pRB/E2F-Signalweg neben den anderen zuvor beschriebenen biologischen Prozessen vermutlich auch die miRNA-Biogenese mitsteuert. Interessanterweise werden verschiedene Ebenen der miRNA-Biogenese potenziell von E2F3 reguliert (Abb. 3.19B): während der miRNA-Biogenese werden die miRNA-Primärtranskripte im Zellkern von dem DGCR8/Drosha-Komplex zu pre-miRNAs hydrolysiert [178], welche über Exportin 5 als Exportprotein aus dem Kern geschleust werden [179, 180]. Im Cytoplasma werden die pre-miRNAs durch DICER zu einer doppelsträngigen miRNA geschnitten [181]. Daraufhin wird eine der beiden Stränge in den RISC (RNA-induced silencing complex)-Komplex inkorporiert [182], wobei die RNA den RISC-Komplex zu seinen Ziel-mRNAs führt. Dementsprechend werden sowohl die frühen Proteine der miRNA-

Biogenese wie DGCR8 oder Exportin 5 durch E2F3 reguliert, aber auch RHA als Teil des RISC-Komplexes [183] ist ein direktes Ziel des pRB/E2F-Signalwegs.

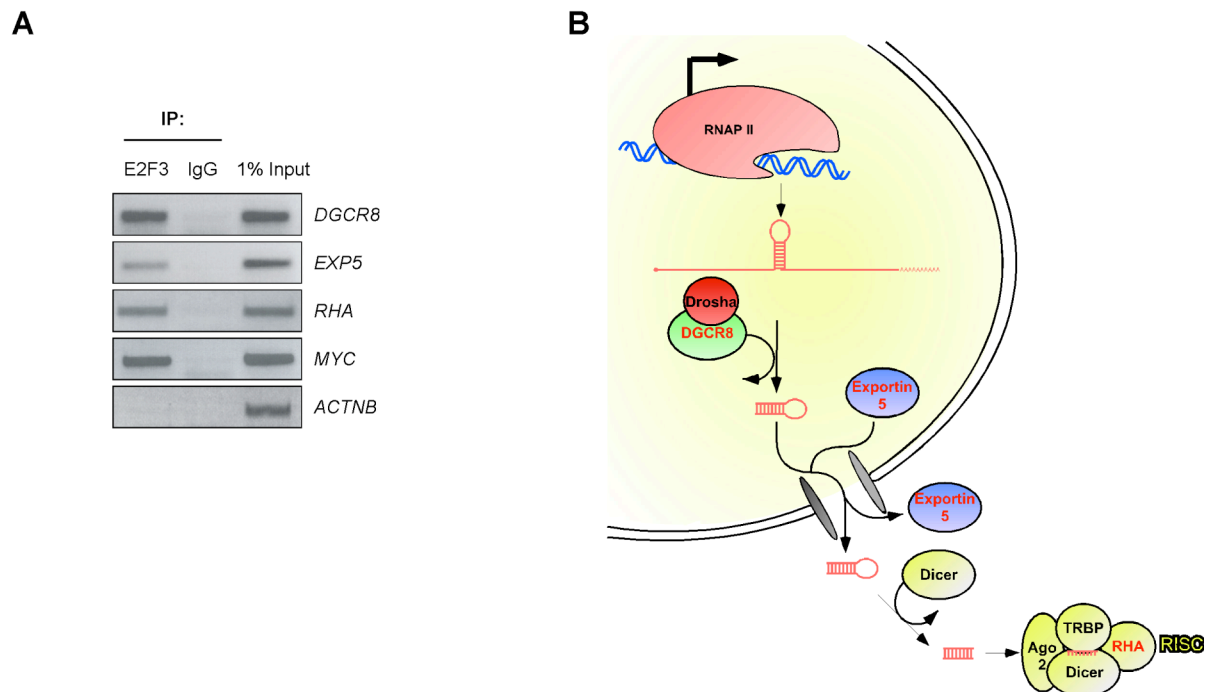


Abb. 3.19: E2F3 bindet an die Promotoren von Genen mit Funktion in der miRNA-Biogenese

A) Chromatin von HCT116 Zellen wurde mit einem E2F3-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und die präzipitierte DNA in eine semiquantitative PCR eingesetzt. Es wurden die Promotoren für *DGCR8*, *EXP5* und *RHA* auf E2F3-Anreicherung hin untersucht. Der *MYC*-Promotor diente als Positivkontrolle und der *ACTNB*-Promotor als Negativkontrolle. IgG diente als Kontrolle für die Immunpräzipitation. **B)** Schematische Übersicht über die miRNA-Biogenese. Validierte E2F3-Zielgene sind rot hervorgehoben. RNAP II/III = RNA-Polymerase II/III; RISC = RNA-induced silencing complex

4 Diskussion

Durch die Identifikation neuer Interaktionspartner von E2F3 sollte in dieser Arbeit versucht werden, die biochemische Funktion dieses zentralen Zellzyklusregulators besser zu verstehen. Einer der identifizierten Interaktionspartner war die SNF2-ähnliche Helikase HELLS, dessen Funktion offensichtlich ebenfalls essenziell für die normale Ausführung des Zellzyklusprogramms ist. Im Folgenden sollen die Ergebnisse kurz zusammengefasst und kritisch diskutiert werden. Zusätzlich werden die Ergebnisse des ChIP-Seq Experiments für E2F3 diskutiert.

4.1 Identifizierung neuer E2F3-Interaktionspartner per GST-Pulldown

Mit Hilfe des GST-Pulldowns und anschließender Massenspektrometrie konnten eine Vielzahl von potenziellen Interaktionspartnern von E2F3 ermittelt werden. Unter den identifizierten Proteinen waren auch diverse schon beschriebene E2F-interagierende Proteine. Hier wären zum Beispiel die Histonacetyltransferase GCN5L2 und das TRRAP-Protein zu nennen. Diese beiden Proteine sind nicht nur gemeinsame Komponenten des SAGA-Komplexes [184], sondern wurden auch schon als E2F1-interagierende Proteine beschrieben [185]. Zudem konnte für TRRAP schon gezeigt werden, dass es eine essenzielle Rolle bei der E2F-vermittelten Transformation von primären Zellen spielt [149].

Ein weiteres identifiziertes Protein war TIF1BETA (auch KAP1 genannt), das kürzlich auch als ein E2F1-interagierendes Protein beschrieben wurde, welches die transkriptionelle Aktivität von E2F1 inhibiert und dessen proapoptotische Funktion antagonisieren kann [148]. Die Interaktion von TIF1BETA mit E2F3 konnte im Rahmen dieser Arbeit auch bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt), wurde aufgrund der zeitgleich erschienenen Publikation von Wang *et al.* jedoch nicht weiter verfolgt.

Da in der Liste der potenziellen Interaktionspartner schon bekannte E2F-interagierende Moleküle vorhanden waren, konnte somit davon ausgegangen werden, dass sich unter den anderen identifizierten Proteinen auch diverse unbekannte E2F3-Interaktionspartner befanden.

4.1.1 E2F3 interagiert mit der SNF2-ähnlichen Helikase HELLS

Eines der mittels *GST-Pulldown* identifizierten Proteine war die SNF2-ähnliche Helikase HELLS (Abb. 3.2). Der Grund warum HELLS aus der Liste der potenziellen Interaktionspartner ausgewählt wurde, war, dass *E2f3*^{-/-} MEFs und *Hells*^{-/-} MEFs einen sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen. So zeigen z. B. beide *Knockout*-MEFs einen vorzeitigen Eintritt in die Seneszenz [88, 140], eine erhöhte DNA-Instabilität [186, 187], einen Proliferationsdefekt [78, 186] sowie einen Transformationsdefekt [78, 186]. Dies legte nahe, dass beide Proteine eventuell im gleichen Signalweg eine Rolle spielen könnten, weshalb diese Interaktion genauer untersucht wurde.

Die Interaktion von HELLS und E2F3 konnte sowohl *in vitro* (Abb. 3.5 & Abb. 3.6) als auch *in vivo* per Ko-Immunpräzipitation (Abb. 3.3 & Abb. 3.4) bestätigt werden. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die Interaktion von HELLS spezifisch für E2F3 ist, da es weder mit E2F1 noch mit E2F4 interagiert (Abb. 3.6). Mit Hilfe von verschiedenen Deletionsmutanten konnte zudem demonstriert werden, dass E2F3 über die *Marked Box*-Domäne hauptsächlich mit dem N-Terminus von HELLS interagiert (Abb. 3.5 & Abb. 3.6). Vermutlich handelt es sich hier um eine direkte Interaktion, die nicht von anderen Proteinen vermittelt wird, da die beiden Proteine auch in einem GST-IVT Experiment miteinander interagierten (Abb. 3.6). Dafür spricht zudem, dass die Interaktion auch bei der Verwendung von ausschließlich bakteriell exprimierten Proteinen beobachtet werden kann (Daten hier nicht gezeigt).

Wie schon in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei der *Marked Box*-Domäne, um diejenige Domäne der E2F-Transkriptionsfaktoren, welche maßgeblich die Identität der E2F-Proteine und deren biologische Funktion bestimmt.

Für E2F3 wurden schon weitere Proteine beschrieben, die an die *Marked Box*-Domäne binden: TFE3 [188, 189] und RYBP [190]. Bei TFE3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der an E-Box Elemente (CACGTG) bindet, während RYBP selbst keine DNA-Bindungsdomäne besitzt. RYBP interagiert jedoch mit dem Transkriptionsfaktor YY1 und fungiert somit als Brückenmolekül zwischen YY1 und E2F3. Diese drei Publikationen, die alle von der Arbeitsgruppe von Joseph Nevins veröffentlicht wurden, gehen von der Hypothese aus, dass ein Teil der Spezifitäten der E2F-Transkriptionsfaktoren von weiteren Transkriptionsfaktoren vermittelt werden, die spezifisch mit den verschiedenen E2F-Transkriptionsfaktoren, vor allem über die *Marked Box*, interagieren können. Hier dient der Promotor des jeweiligen Zielgens als Plattform für bestimmte Transkriptionsfaktoren. Sind die Bindungsstellen in dem jeweiligen Promotor so angeordnet, dass mehrere Transkriptionsfaktoren an diesen binden können und diese Transkriptionsfaktoren noch zusätzlich untereinander über Protein-Protein-Wechselwirkung miteinander interagieren können, kommt

es zu kooperativen Effekten und zur Stabilisierung der Transkriptionsfaktoren an dem jeweiligen Promotor. Beispielsweise bindet E2F3 an den Promotor des *p68*-Gens, an den auch TFE3 über eine E-Box bindet [189]. Der Verlust von TFE3 führt in diesem Fall zu einer verminderten Bindung von E2F3 und umgekehrt. Daraus folgt eine verminderte Aktivierung von *p68* während des Zellzyklus, während andere E2F-Zielgene vom TFE3-Verlust nicht betroffen sind.

4.1.2 E2F3 kann HELLS zu Promotoren von E2F-Zielgenen rekrutieren

Per ChIP konnte sowohl die Bindung von HELLS an diverse E2F-Zielgene (Abb. 3.7 & Abb. 3.8), als auch eine erhöhte HELLS-Bindung an E2F-Zielgene nach induzierter E2F3-Rekrutierung demonstriert werden (Abb. 3.9D). Dies legt den Schluss nahe, dass HELLS über Protein-Protein-Interaktion von E2F3 zu diesen Promotoren rekrutiert wird. Allerdings führt der Verlust von E2F3 nur zu einer reduzierten Rekrutierung von HELLS, nicht aber zu einem kompletten Verlust der HELLS-Bindung an den untersuchten E2F-Zielgenen (Abb. 3.10). Eine mögliche Erklärung wäre, dass auch E2F2 (welches bei den Protein-Protein-Interaktionsstudien nicht untersucht wurde) an HELLS bindet und so den Verlust von E2F3 teilweise kompensieren kann. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass HELLS zusätzlich an bestimmte Histonvarianten und/oder Histonmodifikationen bindet, die sich in E2F-regulierten Promotoren finden. Somit könnte diese Bindung dazu führen, dass HELLS nach E2F3-Verlust noch (wenn auch schwächer) an E2F-Zielgene binden kann. Ein ähnliches Phänomen existiert bei den SNF2-ähnlichen Helikasen der CHD-Familie. Diese können über ihre Chromodomäne (daher ihr Name) an methyliertes Lysin 4 von Histon H3 binden und so verankert werden [191]. In unserem Labor konnte eine Interaktion von HELLS mit der Histonvariante H2A.Z nachgewiesen werden (Katharina Möllman; unveröffentlichte Daten), so dass dies auch eine mögliche Erklärung für die E2F3-unabhängige Rekrutierung bieten könnte. H2A.Z wird mit Hilfe des p400-Komplexes gegen das kanonische Histon H2A ausgetauscht [116, 192, 193], wodurch es zu einer lokalen Inkorporation dieser Histonvariante kommt. Interessanterweise konnte schon eine E2F-abhängige Rekrutierung von Untereinheiten des p400-Komplexes an E2F-Zielgene nachgewiesen werden [117], so dass es hierdurch auch zur lokalen Anreicherung von H2A.Z in den Promotoren von E2F-Zielgenen kommen könnte, welche wiederum bei der Rekrutierung von HELLS helfen könnte. Um diese Hypothese zu testen, müsste zunächst die Interaktion von HELLS und H2A.Z genauer charakterisiert werden und es müsste zusätzlich überprüft werden, ob eine Depletion von H2A.Z ebenfalls zu einer verminderten Bindung von HELLS führt.

Ein ChIP-Seq Experiment, welches die genomweite Bindung von E2F3 und HELLS untersucht, wäre zudem sehr hilfreich bei der Frage, ob HELLS an allen E2F-Zielgenen nachgewiesen werden kann oder ob HELLS nur an einen Teil von E2F-Zielgenen bindet. Leider waren die ChIP-Seq Versuche für HELLS bis jetzt nicht erfolgreich, so dass noch keine Informationen über die genomweite Bindestellen von HELLS existieren. Ein Grund hierfür ist mit Sicherheit das Problem, dass Faktoren, welche nur über Protein-Proteininteraktion an DNA binden (also selbst keine DNA-Bindungsdomäne besitzen) nicht so gut durch Formaldehyd an das Chromatin kreuzvernetzt werden können. Hierdurch ist die Signal-zu-Hintergrund Ratio bei diesen Faktoren bedeutend geringer als bei Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich könnte ein weiteres Problem sein, dass die erhältlichen HELLS-Antikörper nicht ideal für ChIP-Experimente geeignet sind.

4.1.3 E2F3 benötigt HELLS zur Aktivierung seiner Zielgene

Durch die shRNA-vermittelte Depletion von HELLS konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass HELLS essenziell für die Aktivierung von E2F-Zielgenen (Abb. 3.12) und die S-Phaseinduktion (Abb. 3.13B) beim Wiedereintritt in den Zellzyklus ist. Selbst eine starke Überexpression von E2F3 durch Verwendung des HA-ER-E2F3a Systems war nicht in der Lage die verminderte Aktivierung von E2F-Zielgenen nach HELLS-Depletion zu kompensieren (Abb. 3.14A), so dass die biologische Funktion von E2F3 von der Anwesenheit von HELLS abhängt.

HELLS war bis jetzt nur als Repressor von Genen beschrieben und somit zeigt die hier beschriebene Rolle für die Aktivierung von E2F-Zielgenen eine neue Funktion dieser SNF2-ähnlichen Helikase auf. Wie zuvor bereits erwähnt, scheint die repressive Funktion von HELLS unabhängig von dessen enzymatischer Funktion zu sein, da die N-terminale DNMT3a/b-Interaktionsdomäne für die Repression in einem GAL4-Reportersystem ausreicht [138]. Die N-terminale Domäne ist auch diejenige Domäne, die präferenziell an E2F3 bindet (Abb. 3.6). Somit wäre denkbar, dass E2F3 und DNMT3a/b um die gleiche Bindestelle in HELLS kompetieren, so dass der DNMT-HDAC-HELLS Komplex eine repressorische Rolle erfüllt, während der E2F3-HELLS Komplex als Aktivator wirken kann. Ungeklärt ist allerdings, ob für die aktivierende Rolle von HELLS dessen enzymatische Aktivität notwendig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Punktmutante hergestellt, in der das Lysin an Position 254 durch ein Alanin ersetzt wurde (K254A). Dieses Lysin liegt in dem ATP-Bindungsmotiv von HELLS und ist in allen *Chromatin Remodelling*-Faktoren hundertprozentig konserviert. Bei allen publizierten Punktmutationen in diesem Lysin führte dies zu einem Verlust der enzymatischen Funktion und zu einem dominant-negativen Protein [92, 119]. Leider waren nach

Überexpression der HELLS K254A-Mutante keine Effekte auf die Induktion von E2F-Zielgenen oder die Zellproliferation zu beobachten, welche dem Phänotyp nach HELLS-Depletion entsprochen hätten. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Zum einen könnten die Expressionslevel der Mutante nicht ausgereicht haben, um die endogenen HELLS-E2F3 Interaktionen in genügender Art und Weise zu verdrängen. Auch wenn die Expression von HELLS K254A in MEFs höher war als endogenes HELLS (Daten hier nicht gezeigt), könnten die verbliebenen HELLS-E2F3 Komplexe noch ausgereicht haben, um ihre Funktion zu erfüllen. Hierfür spricht, dass für die beobachteten Effekte nach HELLS-Depletion immer ein sehr guter *knockdown* von HELLS nötig war (Daten hier nicht gezeigt), so dass wahrscheinlich E2F3 im Vergleich zu HELLS in substöchiometrischen Mengen in der Zelle vorkommt und somit bei einer schwachen HELLS-Depletion (oder geringen Überexpression der HELLS K254A-Mutante) immer noch genügend HELLS zur Verfügung steht, um die Bindungsstellen an E2F3 abzusättigen. Ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass die HELLS K254A-Mutante nicht mehr mit E2F3 interagieren kann, da dies überprüft wurde (Daten hier nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Funktion von HELLS als E2F3-Kofaktor unabhängig von dessen ATPase-Funktion ist. Um dies zu überprüfen wäre es sinnvoll eine shRNA-resistente Version von HELLS zu klonieren, so dass nach der Depletion von endogenem HELLS die Expression wieder hergestellt werden könnte. Gleichzeitig könnte man eine shRNA-resistente HELLS K254A-Mutante wieder in HELLS-depletierten Zellen exprimieren. Falls sowohl shRNA-resistentes HELLS Wildtyp als auch HELLS K254A die Effekte nach HELLS-Depletion revertieren könnten, wäre die HELLS-Funktion ATPase-unabhängig, falls die Punktmutante die Effekte nicht revertieren könnte, wäre die HELLS-Funktion hier somit ATPase-abhängig.

4.1.4 HELLS-Depletion führt zu einem verlangsamten Eintritt in die S-Phase

Durch die shRNA-vermittelte Depletion von HELLS kam es zu einem verlangsamten Wiedereintritt von serumdepletierten T98G Zellen in die S-Phase nach Seruminduktion (Abb. 3.13 A-B). Dies kann leicht durch die verminderte Induktion von E2F-Zielgenen nach HELLS-Depletion erklärt werden, da es sich zum Beispiel bei CDC6 um einen essenziellen Faktor für die Replikationsinitiation handelt [194]. Schwieriger zu erklären ist der Fakt, dass auch asynchrone Zellen wie die hier gezeigten NIH3T3-Zellen (Abb. 3.13D-F) trotz unveränderter Expression von E2F-Zielgenen (waren unverändert wie in den T98G Zellen von Abb. 3.11) einen erheblichen Proliferationsdefekt aufwiesen. Auch asynchrone T98G Zellen wiesen einen Proliferationsdefekt auf, dieser wurde jedoch nicht so genau untersucht wie der Defekt in NIH3T3 Zellen.

Als Grund für das verminderte Zellwachstum wäre auch eine erhöhte Apoptoserate denkbar. Allerdings konnte in HELLS-depletierten NIH3T3 Zellen weder eine erhöhte Apoptoserate (durch Annexin V-Färbung) noch eine erhöhte p53-Aktivität detektiert werden, da die Expressionslevel des p53-Zielgens p21 nicht verändert waren (Daten hier nicht gezeigt). Zudem zeigte eine Expressionsanalyse per *Microarray* in HELLS-depletierten asynchronen NIH3T3 Zellen keinen Hinweis auf deregulierte Expression von Apoptose-assoziierten Genen (Daten hier nicht gezeigt).

Bezüglich der unveränderten Expression von E2F-Zielgenen nach HELLS-Depletion in asynchronen Zellen ist anzumerken, dass in *E2f3*^{-/-} MEFs auch ein ähnliches Phänomen zu beobachten ist, da asynchrone *E2f3*^{-/-} MEFs zwar einen tiefen Zellzyklusdefekt aufweisen [78, 195], die Expression von E2F-Zielgenen jedoch nicht verändert ist (Caroline Schreiber, unveröffentlichte Daten). Dies ändert sich jedoch nach der Synchronisation von *E2f3*^{-/-} MEFs, da daraufhin auch eine verminderte Induktion von diversen E2F-Zielgenen zu beobachten ist [78]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass E2F3 nicht nur zur Aktivierung der Zielgene, sondern auch wieder zur anschließenden Repression der Zielgene benötigt wird. Somit würden sich in asynchronen Zellen die verminderte Induktion und die erhöhte Derepression gegenseitig aufheben. Ähnliches wäre für HELLS vorstellbar, auch wenn es bis jetzt noch keine Hinweise für HELLS oder E2F3 in der anschließenden Repression von E2F-Zielgenen gibt.

4.1.5 HELLS ist selbst ein direktes E2F-Zielgen

Vorige Publikationen [151, 162] und Experimente in dieser Arbeit (Abb. 3.12A & Abb. 3.15C) zeigten, dass HELLS während der S-Phaseinduktion transkriptionell hochreguliert wird. Zudem wurde *Hells* per *Microarray*-Analyse in unserem Labor als ein dereprimiertes Gen in *Rb*^{-/-} MEFs identifiziert (Caroline Schreiber; unveröffentlichte Daten). Dies legte die Vermutung nahe, dass HELLS selbst ein direktes E2F-Zielgen sein könnte. Diese Hypothese konnte experimentell bestätigt werden, da in unabhängigen Experimenten die Expression von HELLS sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in *Rb*^{-/-} MEFs erhöht war (Abb. 3.15A-B). Zudem konnte per ChIP in MEFs nachgewiesen werden, dass der *Hells*-Promotor von E2F-Transkriptionsfaktoren gebunden wird (Abb. 3.15E). Leider war der humane *HELLS*-Promotor per PCR nicht amplifizierbar, so dass per herkömmlicher ChIP nicht untersucht werden konnte, ob humanes HELLS auch durch E2F-Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann. Allerdings wurde der *HELLS*-Promotor als E2F3-Zielgen in dem ChIP-Seq Experiment von HCT116 Zellen identifiziert (s. Anhang).

HELLS wurde schon zuvor in E2F-Überexpressionstudien mit anschließender Expressionsanalyse per *Microarray* als ein potenzielles Zielgen identifiziert [54] , auch wenn hier der Beweis für eine direkte Regulation nicht erbracht wurde. In dieser Studie wurde das Expressionsprofil von MEFs nach Überexpression von E2F1 oder E2F3 bestimmt. Wie zuvor schon erwähnt, ergeben sich für die beiden Mitglieder der E2F-Familie unterschiedliche Gensignaturen, die wiederum prädiktiv für deregulierte E2F1- oder E2F3-Aktivität genutzt werden können. Bei dem Vergleich der Listen mit den Genen, die als Prädiktor für E2F1 oder E2F3 fungieren können, ergibt sich eine Überschneidung von nur einem einzelnen Gen, nämlich *HELLS*. Was die genaue biologische und funktionelle Bedeutung von dieser Regulation ist, bleibt zwar ungeklärt, jedoch legt dies nahe, dass es sich bei *HELLS* um einen vermutlich wichtigen neuen Bestandteil des pRB-E2F-Signalwegs handelt.

4.1.6 *HELLS* und E2F3 sind in fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms überexprimiert

Die Rolle von E2F3 als Onkogen wurde schon in verschiedenen Publikationen sowohl *in vitro* [196] als auch *in vivo* durch Mausmodelle demonstriert [197, 198] . Konsistent mit diesen Daten kann man auch in verschiedenen humanen Tumorarten eine E2F3-Überexpression detektieren, so dass eine deregulierte E2F3-Expression wahrscheinlich auch in bestimmten Tumorentitäten zur Malignität beiträgt. Ein für E2F3 gut untersuchtes Beispiel ist das Prostatakarzinom, da hier eine erhöhte E2F3-Expression mit einer schlechteren Überlebensrate des Patienten korreliert.

In Übereinstimmung mit vorigen Studien [145, 169, 199] konnte auch in dieser Arbeit eine erhöhte E2F3-Expression in späten Stadien des Prostatakarzinoms demonstriert werden (Abb. 3.16A-B). Eine ähnliche Korrelation konnte auch für *HELLS* demonstriert werden (Abb. 3.16A&C), so dass nicht nur E2F3 sondern auch sein essenzieller Kofaktor in diesen Tumoren überexprimiert ist.

Es ist besonders interessant, dass E2F3 und *HELLS* nur in den späteren, wesentlich aggressiveren Stadien des Prostatakarzinoms überexprimiert sind, was nahe legt, dass E2F3 und *HELLS* vermutlich nicht bei der eigentlichen Tumorinitiation, sondern bei der späteren Tumorprogression eine Rolle spielen. Welche genauen biologischen Prozesse in der Tumorprogression von E2F3 und *HELLS* reguliert werden, ist allerdings noch unklar.

Jedoch legen die hier vorgelegten *in vitro*-Analysen nahe, dass diese Tumore, die E2F3 und HELLS überexprimieren, ein mögliches Ziel für pharmakologische Intervention bieten könnten. Kleine Moleküle, welche die Interaktion von HELLS mit E2F3 inhibieren könnten, würden somit potenziell als Therapie für Prostatakarzinome in Frage kommen. Allerdings müsste zunächst an einem geeigneten Mausmodell überprüft werden, ob zum einen die Überexpression von E2F3 und/oder Depletion von pRB in der Prostata zu einem Tumorphänotyp führt, welcher durch die Deletion von HELLS vermindert werden kann.

Da HELLS selbst ein E2F-Zielgen ist, kann im Moment nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten Überexpression von HELLS auch um einen sekundären Effekt handeln könnte, so dass die erhöhte E2F3-Expression zu einer erhöhten Transkription von HELLS (als E2F-Zielgen) führen würde.

Die erhöhte E2F3-Expression kann jedoch nicht einfach auf eine erhöhte Proliferationsrate (und dadurch indirekt erhöhte E2F3-Level) zurückgeführt werden, da in allen immunhistochemischen Studien (auch in dieser Arbeit) ein E2F3-Antikörper verwendet wurde, der sowohl das zellzyklusregulierte E2F3a als auch das konstitutiv exprimierte E2F3b erkennt. Somit werden durch diesen Antikörper nicht nur einfach Zellen erkannt, die sich gerade in der S-Phase befinden, wie es bei einem E2F3a-spezifischem Antikörper zu erwarten wäre. Ungeklärt ist allerdings noch, was die molekulare Grundlage für die E2F3-Überexpression in Prostatakarzinomen ist, da hier keine Amplifikation von E2F3 wie im Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden konnte [33, 145, 200] .

4.1.7 Modell

Die SNF2-ähnliche Helikase HELLS wurde bisher ausschließlich als ein Repressor beschrieben [201] . Diese Repression wird vor allem über eine Interaktion mit den DNA-Methyltransferasen DNMT3B und DNMT1 sowie den Histondeacetylasen HDAC1/2 vermittelt [138, 139] . Bei der Assoziation mit E2F3 konnten für HELLS keine reprimierenden Eigenschaften nachgewiesen werden. Hier wird HELLS vielmehr für die Induktion von E2F-Zielgenen benötigt, so dass hier eine neue Funktion von HELLS als aktivierender Kofaktor beschrieben wird (Abb. 4.1). Interessanterweise bindet E2F3 an die gleiche Domäne von HELLS wie DNMT3B, so dass beide Proteine vermutlich um die gleiche Bindestelle kompetieren. Hierdurch könnte verhindert werden, dass HELLS ebenfalls reprimierende Aktivitäten wie DNA-Methyltransferasen und HDACs an E2F-regulierte Promotoren rekrutieren würde, was allerdings deren Aktivierung behindern würde. Umgekehrt würde so ebenfalls verhindert, dass E2F3 und mögliche assoziierte Koaktivatoren zu HELLS-reprimierten Genen (wie be-

stimmten *Hox*-Genen) rekrutiert würden, welche dann wiederum die Repression antagonisieren würden. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass E2F3 nicht am *Hoxa7*-Gen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.10C), welches von dem HELLS/DNMT3B-Komplex gebunden und reprimiert wird [139] .

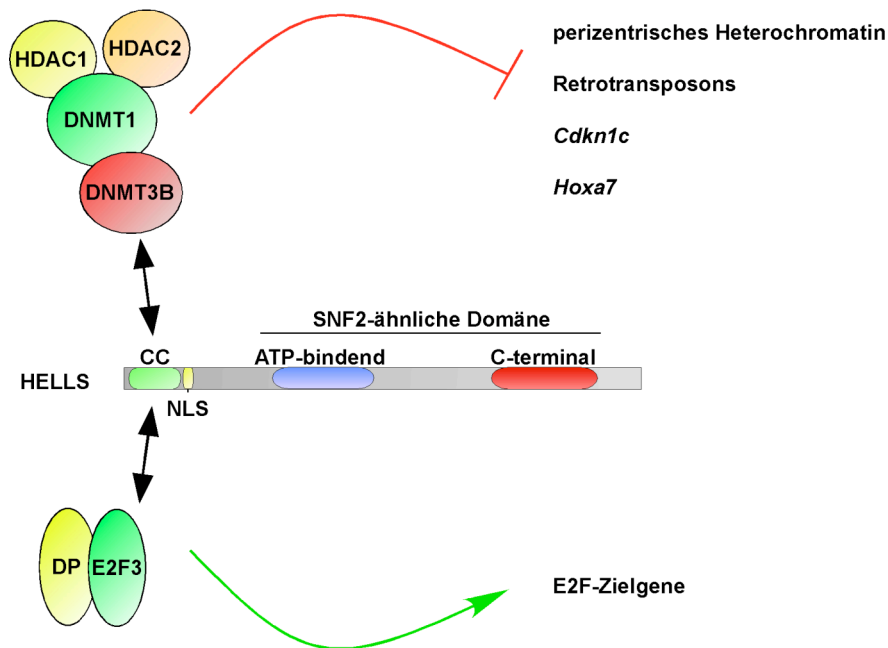


Abb. 4.1: HELLS wirkt als Repressor in Assoziation mit DNMT3B und als Aktivator in Assoziation mit E2F3

Welche Rolle HELLS genau an den E2F-regulierten Promotoren erfüllt, bleibt jedoch unklar. Zudem ist bis jetzt nicht geklärt, ob seine enzymatische Funktion für die Aktivierung von E2F-Zielgenen benötigt wird, da die Überexpression der HELLS K254A Mutante allein keinen Effekt hatte. Somit wären mindestens zwei Modelle denkbar, welche die aktivierende Funktion von HELLS an E2F-Zielgenen erklären könnten. In einem Rekrutierungsmodell (Abb. 4.2A) wäre die aktivierende Funktion von HELLS unabhängig von dessen enzymatischer Funktion, da HELLS alleine als Strukturprotein zur Rekrutierung eines noch nicht identifizierten Kofaktors fungieren würde. Ausgeschlossen werden kann hingegen die Möglichkeit, dass HELLS als Brückenmolekül zu einem noch nicht identifizierten sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor dient. Dies wurde zum Beispiel für E2F3 und RYBP beschrieben [190] . Hier dient RYBP als Brückenmolekül zwischen E2F3 und dem Transkriptionsfaktor YY1, so dass Promotoren mit benachbarten E2F- und YY1-Bindestellen (zum Beispiel beim *CDC6*-Promotor) von YY1 und E2F3 kooperativ gebunden werden. Da jedoch die DNA-Bindung

von HA-ER-E2F3 nach OHT-Induktion in HELLS-depletierten Zellen nicht vermindert (eher sogar verstärkt war) (Abb. 3.14A), ist eine kooperative HELLS-vermittelte DNA-Bindung von E2F3 mit einem anderen Transkriptionsfaktor sehr unwahrscheinlich.

Als alternatives Modell hierzu besteht das *Remodelling*-Modell (Abb. 4.2B), welches davon ausgeht, dass HELLS nach der E2F3-vermittelten Rekrutierung an den Promotoren durch seine ATPase-Funktion als *Chromatin-Remodelling*-Enzym fungiert und so positiv auf die Induktion von E2F-Zielgenen wirkt. Durch Micrococcus-Nuklease-Verdau konnten keine Unterschiede in der translationalen Anordnung der Nukleosomen an dem *CDC6*-Promotor zwischen kontrollinfizierten Zellen und HELLS-depletierten Zellen identifiziert werden (Daten hier nicht gezeigt). Jedoch könnte durch weitere Experimente, wie zum Beispiel DNase I-Verdau, die Lage der DNA auf den jeweiligen Nukleosomen und die potenzielle Veränderung nach HELLS-Depletion genauer untersucht werden.

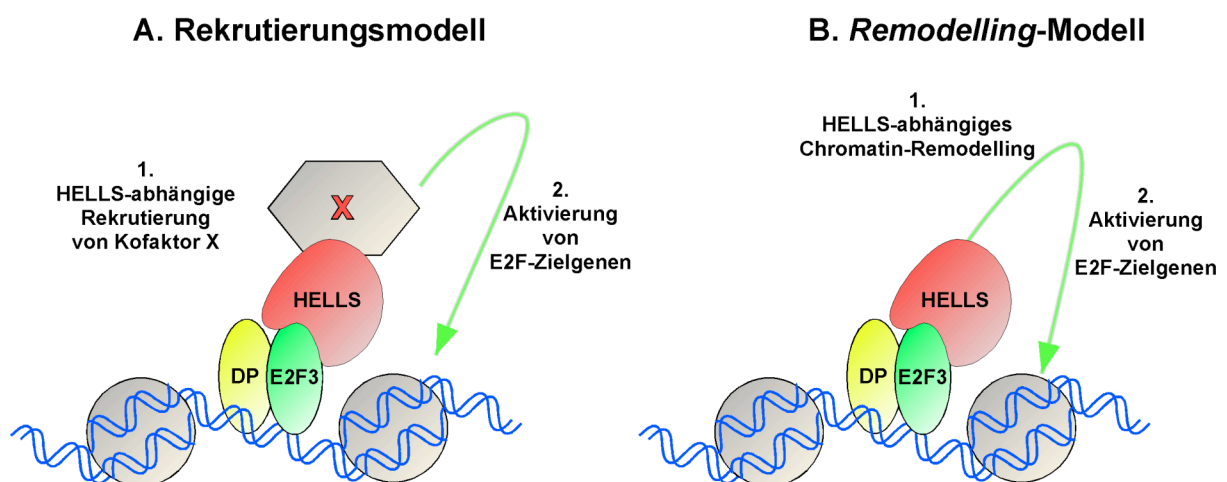


Abb. 4.2: Mögliche Modelle für HELLS als Kofaktor bei der Aktivierung von E2F-Zielgenen

Da HELLS selbst auf transkriptioneller Ebene von pRB negativ reguliert wird (Abb. 3.15), ergibt sich zusammen mit der Tatsache, dass HELLS selbst essenziell für die Aktivierung von E2F-Zielgenen ist (Abb. 3.12 & Abb. 3.14), ein zusätzlich interessantes Modell für die Wirkungsweise von pRB als Tumorsuppressor (Abb. 4.3). Bei Verlust von pRB kommt es somit zur Derepression der HELLS-Expression, so dass dieser E2F3-Kofaktor vermehrt exprimiert wird und dadurch zur ektopischen Aktivierung von E2F-Zielgenen zur Verfügung steht. Somit handelt es sich bei HELLS nicht nur um einen neuen E2F3-Interaktionspartner, sondern ebenfalls um ein neues transkriptionelles Zielgen im pRB/E2F-Signalweg. Vermutlich reguliert HELLS auch selbst seine eigene Transkription als E2F-Zielgen, da HELLS

selbst an allen untersuchten E2F-Zielgenen nachgewiesen werden konnte. Somit ergäbe sich hieraus ein positiver Rückkopplungsmechanismus (Abb. 4.3), da die aktivierenden E2F1-3 Transkriptionsfaktoren die Transkription von HELLS regulieren und HELLS daraufhin verstärkt an seinen eigenen Promotor binden könnte, um dessen Aktivität weiter zu verstärken. Solche positiven Rückkopplungsmechanismen findet man sehr häufig in der Regulation des pRB/E2F-Signalwegs, so ist zum Beispiel Cyclin E, welches zusammen mit CDK2 pRB inaktiviert (Abb. 1.2), selbst ein direktes Ziel von E2F-Transkriptionsfaktoren [202]. Solche positiven Rückkopplungsmechanismen definieren laut mathematischen Modellierungen in Kombination mit Promotorstudien einen so genannten bistabilen Zustand, der sich spezifisch bei E2F-regulierten Promotoren findet [203] und vermutlich den Restriktionspunkt mitdefiniert. Der Begriff bistabil bedeutet, dass in Abhängigkeit von der Serumkonzentration bei dem untersuchten E2F-regulierten Promotor nur zwei Aktivitätszustände detektiert werden konnten: aktiviert oder reprimiert. Dementsprechend gibt es nur zwei stabile und keine intermediären Zustände von E2F-regulierten Promotoren. Dieser bistabile Schalter spielt vermutlich bei der Entscheidung am Restriktionspunkt für eine erneute Zellteilung oder einen Eintritt in die Qieszenz eine entscheidende Rolle. In wie weit HELLS selbst zu dieser Entscheidung beiträgt, müsste durch zusätzliche Experimente evaluiert werden. Ein interessanter Ansatz wäre zum Beispiel die Generierung von *Hells*^{-/-} *Rb*^{-/-} Mäusen und *Hells*^{-/-} *Rb*^{-/-} MEFs. Hier wäre zu erwarten, dass diese Mäuse, in einer ähnlichen Weise wie *E2f3*^{-/-} *Rb*^{-/-} Mäuse [80], auch einen verminderten ektopischen S-Phaseeintritt im Vergleich zu *Rb*^{-/-} Mäusen aufweisen.

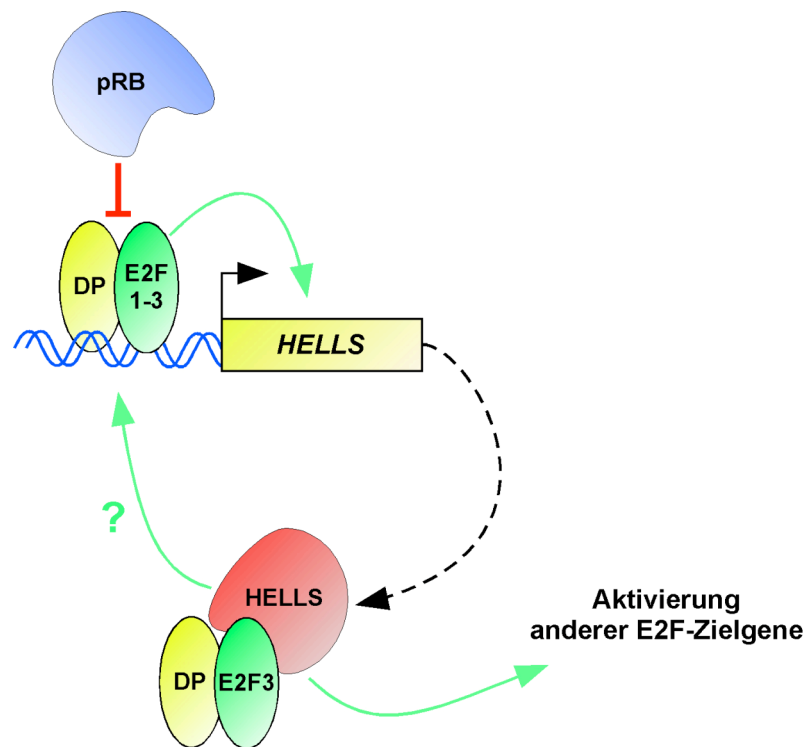


Abb. 4.3: HELLs als neue Komponente des pRB/E2F-Signalwegs

E2F1-3/DP Heterodimere binden an den *HELLs* Promotor und transaktivieren diesen, während pRB den *HELLs* Promotor reprimiert. Die E2F3/DP-HELLs Komplexe binden daraufhin an die Promotoren anderer E2F-Zielgene und vermutlich an den *HELLs*-Promotor (?), so dass eine positive Rückkopplungsschleife entsteht.

4.2 Identifizierung neuer E2F3-Zielgene durch ChIP-Seq

Auch wenn es von den Phänotypen der Knockoutmäuse her relativ eindeutig ist, dass E2F3 den wichtigsten aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktor darstellt, so ist es relativ erstaunlich, dass bis zu Beginn dieser Arbeit keine *ChIP-on-Chip*-Studie für E2F3 publiziert war. In der Zwischenzeit wurde eine Studie für E2F3 publiziert, welche die Rolle von E2F3 während der Myogenese untersucht [100]. In dieser Studie wurden ca. 1000 E2F3-Zielgene beschrieben, so dass diese Zahl um den Faktor 2,5 geringer ist, als in dieser Arbeit, da hier 2690 Gene identifiziert wurden. Somit konnten mit dem ChIP-Seq Ansatz über 1500 neue direkte E2F3-Zielgene identifiziert werden. Unter den neu identifizierten Genen waren auch solche, die in biologischen Prozessen involviert sind, die bis jetzt noch nicht mit dem E2F/pRB-Signalweg in Verbindung gebracht wurden. Es konnten z. B. diverse Proteine der miRNA-Biogenese als direkte E2F3-Zielgene bestätigt werden (Abb. 3.19), so dass der pRB/E2F-Signalweg ver-

mutlich auch die Prozessierung von miRNAs über die Regulation der Biogenesemaschinerie kontrolliert (Abb. 4.4). Konsistent mit der Beobachtung, dass diese Bestandteile der miRNA-Biogenese direkte E2F-Zielgene sind, konnte in unserem Labor für DGCR8, EXP5, RHA und DICER zum Teil eine Derepression in *Rb*^{-/-} MEFs und eine zellzyklusabhängige Expression demonstriert werden (Sebastian Memczak; unveröffentlichte Daten). Interessanterweise zeigen *Dicer*^{-/-} MEFs genauso wie *E2f3*^{-/-} MEFs eine Induktion von p19^{Arf} und p53 [88, 204]. Allerdings kann, wie schon zuvor erwähnt, p19^{Arf} durch verschiedenste Formen des Zellstress ausgelöst werden, so dass zunächst geklärt werden müsste, ob Teile der Effekte in *E2f3*^{-/-} MEFs durch die gestörte Expression von DICER oder anderen Komponenten der miRNA-Biogenesemaschinerie in diesen Zellen erklärt werden könnten.

Zusätzlich zu neuen proteinkodierenden Genen konnten 100 miRNAs selbst als potenzielle E2F3-Zielgene identifiziert werden. Diese Zahl ist allerdings womöglich noch unterschätzt, da als Referenz für die miRNA-Promotoren ein ChIP-Seq Experiment aus humanen Stammzellen verwendet wurde [175]. Dadurch können solche miRNA-Promotoren nicht identifiziert werden, welche in HCT116 Zellen aber nicht in humanen Stammzellen exprimiert werden.

Für die identifizierten E2F3-regulierten miRNAs stellt sich die Frage, wie diese auf den Zellzyklus und andere E2F-regulierte Prozesse einwirken. Die Effekte von miRNAs auf die Expression ihrer Ziele sind in der Regel relativ mild [205] und es wurde somit postuliert, dass miRNAs hauptsächlich in der Feinabstimmung der Proteinexpression wirken [174, 206]. Somit wäre es möglich, dass E2F3-regulierte miRNAs wiederum die transkriptionellen Ziele von E2F3 herunterregulieren, was eine Art Pufferfunktion für E2F3-regulierte miRNAs ergeben würde.

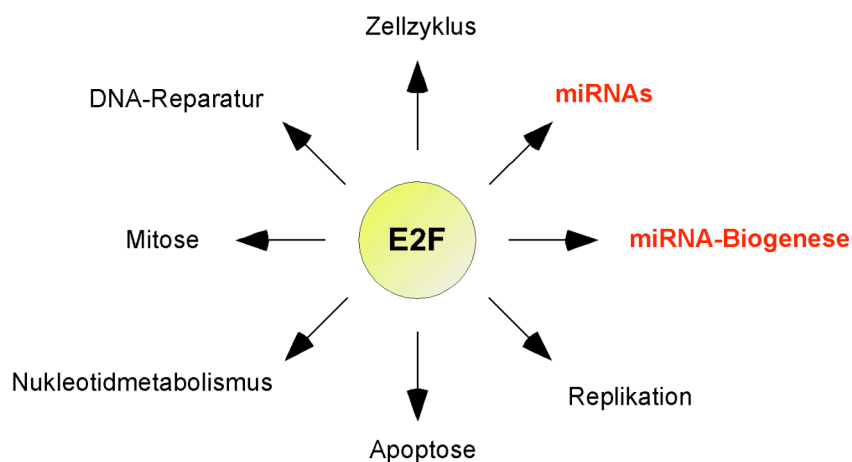


Abb. 4.4: Der pRB/E2F-Signalweg reguliert eine Vielzahl biologischer Prozesse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Funktionen sind rot hervorgehoben

Ähnliches wurde für die einzige bis jetzt publizierte, E2F3-regulierte miRNA beschrieben, da diese selbst wieder E2F1 und E2F3 herunterreguliert [99, 173] . Ein alternatives Modell hierzu wäre, dass die E2F3-induzierten miRNAs die anderen E2F-abhängigen biologischen Prozesse wie z. B. Zellzyklusinduktion unterstützen würden. So könnten E2F3-regulierte miRNAs Zellzyklusinhibitoren als Ziele haben, so dass deren miRNA-vermittelte Herunterregulation den Übertritt in die S-Phase erleichtern würde. Ähnliches wurde für das E2F1-induzierte mir106b-25 miRNA-Cluster gezeigt, da die miRNAs in diesem Cluster zu einer Herunterregulation des p21^{CIP1} Zellzyklusinhibitors führen [207] .

Um diese Fragen zu klären, müsste eine Auswahl der E2F3-gebundenen miRNAs auf solche Funktionen hin funktionell überprüft werden.

Anhang

Per Massenspektrometrie identifizierte potenzielle GST-E2F3b-Bindungspartner

Gelstück		Anzahl der Peptide
1	KU86	21
	LMNA	13
	KU70	6
	ADT2	3
	ADT3	3
	ECHA	2
	MPCP	1
	COVA1	1
	CLAP1	2
	GPDM	2
2	KU86	24
	NDUS1	5
	MIRO1	5
	TF7L2	5
	ADT2	1
	DHX33	2
	AFG32	1
3	KU86	54
	ADT2	1
	NSMA3	1
4	KU86	20
	IMMT	8
	NSMA3	3
	ADT1	1
	NUP93	1
5	NUP93	26
	KU86	18
	NOC2L	12
	IMMT	14
	LBML3	2
	ADT2	3
	TFR1	1
	CTNB1	1
	PLSB	1
6	NOC2L	18
	LMBL3	10
	DDX21	11
	GCNL2	6
	TFR1	5
	AKAP8	6
	PRKDC	4
	ADT2	3
	SP1	2
	CTNB1	1

7	HELLS	19
	NUCL	19
	LMBL3	4
	ADT2	6
	PRKDC	9
	SP1	1
	NOC2L	5
	GTPB2	2
	DDX21	2
	GCNL2	4
	RBNS5	2
	DOCK8	1
	CCDC9	1
8	NUCL	14
	MSH2	8
	TIF1B	10
	ADT2	5
	PRKDC	1
	AT2A2	1
	RL40	1
	PGAP1	1
	CTNA1	1
	RFC1	1
	SMBT1	1
9	MYO1C	13
	INT6	7
	ZC11A	4
	PRKDC	3
	ZN148	1
	NAT10	1
	AT2A2	1
	RB	1
	INT5	1
	LSD1	1
	NU205	1
	TIF1B	1
10	PARP1	7
	NAT10	8
	HNRPU	5
	MATR3	5
	AT2A2	4
	MYO1B	5
	PRKDC	4
	ADT2	5
	INT3	2
	U5S1	1
	MYO6	1
	ACADS	1
	MPCP	1
	MBB1A	1
	RFC1	1
	SMRA3	1
	NU205	1
11	PRKDC	5
	NAT10	7
	MYO1B	3
	ADT1	2
	SMRA3	2
	MYO6	1
	NOLC1	2

	MPCP	1
	AHTF1	1
	ZBED4	1
	DDB1	1
	MBB1A	1
	DDX41	1
12	PRKDC	11
	CEBPZ	3
	ADT1	3
	LPPRC	2
	MBB1A	1
	RFC1	1
	SHOC2	1
	DPOG1	1
	ARD1	1
	SMCA1	1
	SMCA5	1
13	PRKDC	19
	LPPRC	14
	RFC1	7
	MYO6	4
	ADT2	2
	ADT3A	1
	DHX9	1
	CLAP1	1
14	PRKDC	20
	MBB1A	17
	TCRG1	2
	RFC1	5
	ADT3	4
15	PRKDC	24
	MBB1A	16
	ADT2	5
	MSH6	3
	NU205	1
16	PRKDC	34
	NU205	7
	ADT2	7
	MPCP	1
	GTR1	1
	WRN	2
	MBB1A	1
	PGAP1	1
	CND3	1
	IMPA1	1
17	PRKDC	53
	NU205	25
	ADT2	8
	GTR1	1
	TRRAP	1
	MPCP	1
	NUMA1	1
	AT2A1	1
	SHOC2	1
	NPL4	1
18	PRKDC	102
	ADT2	11
	ADT3	10
	TRRAP	2
	GTR1	1

	ACOD	1
	MPCP	1
	NOTC3	1
	NUMA1	1
19	PRKDC	121
	ADT2	12
	ADT3	11
	ADT1	6
	TRRAP	5
	MPCP	5
	ACOD	1
	EF1A1	1
	GTR1	2
	PGAP1	1
	CLAP1	1
20	ADT2	23
	ADT3	22
	ADT1	14
	PRKDC	13
	MPCP	14
	GPSN2	8
	TMM33	4
	DIC	3
	S27A4	2
	AT2A2	3
	LBR	4
	GTR1	2
	ACOD	1
	RS3	1
	PLCE	2
	S61A1	2
	RAB13	2
	DHCR7	1
	STT3A	1
	AT1A1	1
	KU86	1
	AHTF1	1
	MOT4	1
	RS27L	1

E2F3-gebundene miRNA-Promotoren (± 300 bp vom TSS nach Marson *et al.* 2008)

hsa-let-7a-3-promotor
hsa-let-7b-promotor
hsa-let-7g-promotor
hsa-let-7i-promotor
hsa-mir-100871-promotor
hsa-mir-101-2-promotor
hsa-mir-103-1-promotor
hsa-mir-103-2-promotor
hsa-mir-107-promotor
hsa-mir-124-3-promotor
hsa-mir-130a-promotor
hsa-mir-133b-promotor
hsa-mir-135b-promotor
hsa-mir-140-promotor
hsa-mir-141-promotor
hsa-mir-146b-promotor
hsa-mir-148b-promotor
hsa-mir-151-promotor
hsa-mir-15a-promotor
hsa-mir-15b-promotor
hsa-mir-16-1-promotor
hsa-mir-16-2-promotor
hsa-mir-17-promotor
hsa-mir-18a-promotor
hsa-mir-191-promotor
hsa-mir-193a-promotor
hsa-mir-193b-promotor
hsa-mir-196a-2-promotor
hsa-mir-196b-promotor
hsa-mir-199a-2-promotor
hsa-mir-19a-promotor
hsa-mir-19b-1-promotor
hsa-mir-200c-promotor
hsa-mir-203-promotor
hsa-mir-206-promotor
hsa-mir-20a-promotor
hsa-mir-210-promotor
hsa-mir-214-promotor
hsa-mir-218-1-promotor
hsa-mir-219-1-promotor
hsa-mir-220c-promotor
hsa-mir-22-promotor
hsa-mir-26a-1-promotor
hsa-mir-26a-2-promotor
hsa-mir-301a-promotor
hsa-mir-31-promotor
hsa-mir-326-promotor
hsa-mir-33b-promotor
hsa-mir-340-promotor
hsa-mir-342-promotor
hsa-mir-365-1-promotor

--

hsa-mir-425-promotor
hsa-mir-454-promotor
hsa-mir-484-promotor
hsa-mir-491-promotor
hsa-mir-548c-promotor
hsa-mir-548d-1-promotor
hsa-mir-548d-2-promotor
hsa-mir-549os-promotor
hsa-mir-563-promotor
hsa-mir-566-promotor
hsa-mir-567-promotor
hsa-mir-569-promotor
hsa-mir-572-promotor
hsa-mir-579-promotor
hsa-mir-580-promotor
hsa-mir-583-promotor
hsa-mir-584-promotor
hsa-mir-586-promotor
hsa-mir-597-promotor
hsa-mir-602-promotor
hsa-mir-604-promotor
hsa-mir-605-promotor
hsa-mir-608-promotor
hsa-mir-609-promotor
hsa-mir-611-promotor
hsa-mir-613-promotor
hsa-mir-615-promotor
hsa-mir-616-promotor
hsa-mir-621-promotor
hsa-mir-623-promotor
hsa-mir-624-promotor
hsa-mir-625-promotor
hsa-mir-626-promotor
hsa-mir-627-promotor
hsa-mir-632-promotor
hsa-mir-634-promotor
hsa-mir-635-promotor
hsa-mir-636-promotor
hsa-mir-637-promotor
hsa-mir-639-promotor
hsa-mir-640-promotor
hsa-mir-641-promotor
hsa-mir-643-promotor
hsa-mir-647-promotor
hsa-mir-661-promotor
hsa-mir-877-promotor
hsa-mir-92a-1-promotor
hsa-mir-9-3-promotor

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>Alternative reading frame</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTFs	basale Transkriptionsfaktoren
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIP	<i>CDK inhibitory protein</i>
CKI	CDK-Inhibitor
cDNA	<i>copy DNA</i> , Komplementäre DNA
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP	<i>Dimerization partner</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
E2F	<i>E2 binding factor</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N-tetracetat
	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-
EGTA	tetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden

HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HCF1	<i>Host Cell Factor 1</i>
HDAC	Histondeacetylase
HDM	Histondemethylase
HELLS	<i>Helicase lymphoid-specific</i>
HMT	Histonmethyltransferase
Hox	Homöobox
IF	Immunfluoreszenz
INK4	<i>Inhibitor of Kinase 4</i>
IP	Immunpräzipitation
IVT	<i>in vitro</i> Translation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LSH	<i>Lymphoid-specific helicase</i>
mA	Milliampere
MEF	Mausembryonale Fibroblasten
min	Minuten
ml	Milliliter
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
ng	Nanogramm
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäre Lokalisationssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASG	<i>Proliferation-associated SNF2-like gene</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNAP III	RNA-Polymerase III
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
pmol	Pikomol
pRb	Retinoblastoma-Protein
sec	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SE	<i>Standard error</i> , Standardfehler
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Uracil
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumne
Wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Ich danke Frau Dr. Ulrike Ziebold für die Aufnahme als Doktorand in ihre Arbeitsgruppe am MDC. Darüber hinaus möchte ich mich für ihre lockere Art der Interaktion während dieser Zeit und das von ihr entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung dieses Projekts, sowie ihre zahlreichen Anregungen bei wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei allen jetzigen und vergangenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ziebold für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre während dieser Zeit bedanken, durch welche ich die Zeit am MDC in guter Erinnerung behalten werde.

Allen Verantwortlichen des “International PhD Programme for Molecular Cell Biology” des MDCs möchte ich für die Finanzierung über dieses Programm und die finanzielle Unterstützung bei dem Besuch von Konferenzen danken. Hier wären vor allem Prof. Achim Leutz, Oksana Seumenicht und Annette Schledz zu nennen, da sie durch ihre ambitionierte Arbeit ein Programm mit vielen Weiterbildungsmöglichkeiten für Doktoranden geschaffen haben. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Claus Scheidereit, Prof. Thomas Jentsch und auch Prof. Achim Leutz für hilfreiche Diskussionen und Anregungen während der jährlichen “PhD Committee Meetings” bedanken.

Für die Zusendung von Reagenzien danke ich Prof. Stefan Gaubatz, Prof. Kristian Helin und Prof. Kathrin Mügge.

Für die immunhistochemische Untersuchung und Bereitstellung der humanen Tumore danke ich recht herzlich Prof. Christoph Loddenkemper.

Bei Dr. Hans Otto bedanke ich mich für die massenspektrometrische Analyse des GST-*Pulldowns* und bei Jonas Maaskola, Dr. Catherine Adamidi und Svetlana Lebedeva für die bioinformatische Analyse und technische Hilfe bei dem ChIP-Seq Experiment.

Meinen Freunden Sebastian Diecke und Julian Heuberger danke ich für die vielen wissenschaftlichen und noch zahlreicheren unwissenschaftlichen Diskussionen, ge-

nauso wie für großzügige Fahrdienste und für zahllose schöne Abende wie z. B. „ausufernde“ Burgermahlzeiten.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung in all den Jahren (auch vor der Doktorarbeit) bedanken auf die ich immer zählen konnte. Ein ganz besonders lieber Dank geht an Laura Jänicke, da ihr offenes Ohr und ihre Aufmunterung so manchen wissenschaftlichen Misserfolg abgefedert hat und ohne deren Unterstützung alles bedeutend schwerer gefallen wäre. Danke!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Björn von Eyß

Berlin, den 14. November 2009

Publikationsliste

Publikationen

Osterloh L*, von Eyss B*, Schmit F, Rein L, Hübner D, Samans B, Hauser S, Gaubatz S: The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis (2007)
EMBO Journal, 26(1) : 144-157

*These authors contributed equally to the work

Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, Schmitt K, Franke C, von Eyss B, Gargic S, Hanel F, Brehm A and Gaubatz S: LINC, a human complex that is related to pRB-Containing complexes in invertebrates regulates the expression of G₂/M genes (2007)
Cell Cycle, 6(15): 1903 - 1913

von Eyss B, Loddenkemper C, Otto A, Tanh MD, Ziebold U: The SWI/SNF-like helicase HELLS is a crucial cofactor for E2F-dependent transcription
Manuscript in preparation

Schreiber C, Vormbrock K, von Eyss B and Ziebold U: E2F3 loss reveals a critical requirement to oppose TGF β 1
Manuscript in preparation

Posterpräsentationen bei Konferenzen

08/2008

von Eyss B, Loddenkemper C, Otto A, Tanh MD, Ziebold U:
"The SWI/SNF-like helicase HELLS is a crucial cofactor for E2F-dependent transcription"
Posterpräsentation beim „Benzon Symposium on Transcription, Chromatin and Disease“; Kopenhagen, Dänemark

09/2007

von Eyss B, Otto A, Ziebold U:
"The SWI/SNF-like helicase HELLS interacts with the transcription factor E2F3"
Posterpräsentation beim PhD Retreat des FMP und MDC; Joachimsthal

05/2007

von Eyss B, Ziebold U: „Role of E2F3 in the suppression of senescence“
Posterpräsentation bei der MDC/DKFZ Cancer Summer School; Großdöln

09/2006

von Eyss B, Ziebold U: „A potential role for E2F4 in colon cancer“
Posterpräsentation beim PhD Retreat des FMP und MDC; Motzen

Quellenverzeichnis

- [1] Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, Cell (Band 100), Nr. 1, Seite 57-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10647931
- [2] Meek, D. W. (2009): Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? Nat Rev Cancer (Band 9), Nr. 10, Seite 714-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19730431
- [3] Zetterberg, A. und Larsson, O. (1985): Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 82), Nr. 16, Seite 5365-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3860868
- [4] Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Beach, D. und Lowe, S. W. (1997): Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, Cell (Band 88), Nr. 5, Seite 593-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054499
- [5] Parrinello, S.; Samper, E.; Krtolica, A.; Goldstein, J.; Melov, S. und Campisi, J. (2003): Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts, Nat Cell Biol (Band 5), Nr. 8, Seite 741-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12855956
- [6] Weinberg, R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control, Cell (Band 81), Nr. 3, Seite 323-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7736585
- [7] Jacks, T.; Fazeli, A.; Schmitt, E. M.; Bronson, R. T.; Goodell, M. A. und Weinberg, R. A. (1992): Effects of an Rb mutation in the mouse, Nature (Band 359), Nr. 6393, Seite 295-300. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406933
- [8] Herber, B.; Truss, M.; Beato, M. und Muller, R. (1994): Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter, Oncogene (Band 9), Nr. 4, Seite 1295-304. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8134134
- [9] Won, K. A.; Xiong, Y.; Beach, D. und Gilman, M. Z. (1992): Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 89), Nr. 20, Seite 9910-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1409718
- [10] Koff, A.; Giordano, A.; Desai, D.; Yamashita, K.; Harper, J. W.; Elledge, S.; Nishimoto, T.; Morgan, D. O.; Franza, B. R. und Roberts, J. M. (1992): Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle, Science (Band 257), Nr. 5077, Seite 1689-94. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1388288
- [11] Matsushime, H.; Ewen, M. E.; Strom, D. K.; Kato, J. Y.; Hanks, S. K.; Roussel, M. F. und Sherr, C. J. (1992): Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins, *Cell* (Band 71), Nr. 2, Seite 323-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1423597
- [12] Meyerson, M. und Harlow, E. (1994): Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 3, Seite 2077-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8114739
- [13] Dulic, V.; Lees, E. und Reed, S. I. (1992): Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase, *Science* (Band 257), Nr. 5078, Seite 1958-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1329201
- [14] Kato, J.; Matsushime, H.; Hiebert, S. W.; Ewen, M. E. und Sherr, C. J. (1993): Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4, *Genes Dev* (Band 7), Nr. 3, Seite 331-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8449399
- [15] Zarkowska, T. und Mitnacht, S. (1997): Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 19, Seite 12738-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9139732
- [16] Ewen, M. E.; Sluss, H. K.; Sherr, C. J.; Matsushime, H.; Kato, J. und Livingston, D. M. (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins, *Cell* (Band 73), Nr. 3, Seite 487-97. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8343202
- [17] Polyak, K.; Lee, M. H.; Erdjument-Bromage, H.; Koff, A.; Roberts, J. M.; Tempst, P. und Massague, J. (1994): Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals, *Cell* (Band 78), Nr. 1, Seite 59-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8033212
- [18] Harper, J. W.; Adami, G. R.; Wei, N.; Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* (Band 75), Nr. 4, Seite 805-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8242751
- [19] Serrano, M.; Hannon, G. J. und Beach, D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature* (Band 366), Nr. 6456, Seite 704-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8259215
- [20] Hannon, G. J. und Beach, D. (1994): p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest, *Nature* (Band 371), Nr. 6494, Seite 257-61. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8078588
- [21] el-Deiry, W. S.; Tokino, T.; Velculescu, V. E.; Levy, D. B.; Parsons, R.; Trent, J. M.; Lin, D.; Mercer, W. E.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* (Band 75), Nr. 4, Seite 817-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8242752
- [22] Reynisdottir, I.; Polyak, K.; Iavarone, A. und Massague, J. (1995): Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta, *Genes Dev* (Band 9), Nr. 15, Seite 1831-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7649471
- [23] Zindy, F.; Quelle, D. E.; Roussel, M. F. und Sherr, C. J. (1997): Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging, *Oncogene* (Band 15), Nr. 2, Seite 203-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9244355
- [24] Pomerantz, J.; Schreiber-Agus, N.; Liegeois, N. J.; Silverman, A.; Alland, L.; Chin, L.; Potes, J.; Chen, K.; Orlow, I.; Lee, H. W.; Cordon-Cardo, C. und DePinho, R. A. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53, *Cell* (Band 92), Nr. 6, Seite 713-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529248
- [25] Quelle, D. E.; Zindy, F.; Ashmun, R. A. und Sherr, C. J. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest, *Cell* (Band 83), Nr. 6, Seite 993-1000. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8521522
- [26] Sage, J.; Miller, A. L.; Perez-Mancera, P. A.; Wysocki, J. M. und Jacks, T. (2003): Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry, *Nature* (Band 424), Nr. 6945, Seite 223-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12853964
- [27] Braig, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Rudolph, C.; Peters, A. H.; Schlegelberger, B.; Stein, H.; Dorken, B.; Jenuwein, T. und Schmitt, C. A. (2005): Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development, *Nature* (Band 436), Nr. 7051, Seite 660-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079837
- [28] Chen, Z.; Trotman, L. C.; Shaffer, D.; Lin, H. K.; Dotan, Z. A.; Niki, M.; Koutcher, J. A.; Scher, H. I.; Ludwig, T.; Gerald, W.; Cordon-Cardo, C. und Pandolfi, P. P. (2005): Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis, *Nature* (Band 436), Nr. 7051, Seite 725-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079851
- [29] Collado, M.; Gil, J.; Efeyan, A.; Guerra, C.; Schuhmacher, A. J.; Barradas, M.; Benguria, A.; Zaballos, A.; Flores, J. M.; Barbacid, M.; Beach, D. und Serrano, M. (2005): Tumour biology: senescence in premalignant tumours, *Nature* (Band 436), Nr. 7051, Seite 642. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079833
- [30] Michaloglou, C.; Vredeveld, L. C.; Soengas, M. S.; Denoyelle, C.; Kuilman, T.; van der Horst, C. M.; Majoor, D. M.; Shay, J. W.; Mooi, W. J. und Peeper, D. S. (2005): BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi, *Nature* (Band 436), Nr. 7051, Seite 720-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079850
- [31] Kamb, A.; Gruis, N. A.; Weaver-Feldhaus, J.; Liu, Q.; Harshman, K.; Tavitian, S. V.; Stockert, E.; Day, R. S., 3rd; Johnson, B. E. und Skolnick, M. H. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types, *Science* (Band 264), Nr. 5157, Seite 436-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8153634
- [32] Simpson, J. F.; Quan, D. E.; O'Malley, F.; Odom-Maryon, T. und Clarke, P. E. (1997): Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast, *Am J Pathol* (Band 151), Nr. 1, Seite 161-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9212742
- [33] Oeggerli, M.; Schraml, P.; Ruiz, C.; Bloch, M.; Novotny, H.; Mirlacher, M.; Sauter, G. und Simon, R. (2006): E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer, *Oncogene* (Band 25), Nr. 49, Seite 6538-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16953223
- [34] Oeggerli, M.; Tomovska, S.; Schraml, P.; Calvano-Forte, D.; Schafroth, S.; Simon, R.; Gasser, T.; Mihatsch, M. J. und Sauter, G. (2004): E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer, *Oncogene* (Band 23), Nr. 33, Seite 5616-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15122326
- [35] Kovesdi, I.; Reichel, R. und Nevins, J. R. (1986): Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation, *Cell* (Band 45), Nr. 2, Seite 219-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2938741
- [36] Reichel, R.; Kovesdi, I. und Nevins, J. R. (1987): Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product, *Cell* (Band 48), Nr. 3, Seite 501-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2948654
- [37] Helin, K.; Lees, J. A.; Vidal, M.; Dyson, N.; Harlow, E. und Fattaey, A. (1992): A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F, *Cell* (Band 70), Nr. 2, Seite 337-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1638634
- [38] Kaelin, W. G., Jr.; Krek, W.; Sellers, W. R.; DeCaprio, J. A.; Ajchenbaum, F.; Fuchs, C. S.; Chittenden, T.; Li, Y.; Farnham, P. J.; Blunar, M. A. und et al. (1992): Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties, *Cell* (Band 70), Nr. 2, Seite 351-64. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1638635
- [39] Zheng, N.; Fraenkel, E.; Pabo, C. O. und Pavletich, N. P. (1999): Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP, *Genes Dev* (Band 13), Nr. 6, Seite 666-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10090723
- [40] Litovchick, L.; Sadasivam, S.; Florens, L.; Zhu, X.; Swanson, S. K.; Velmurugan, S.; Chen, R.; Washburn, M. P.; Liu, X. S. und DeCaprio, J. A. (2007): Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence, *Mol Cell* (Band 26), Nr. 4, Seite 539-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17531812
- [41] Wu, L.; Timmers, C.; Maiti, B.; Saavedra, H. I.; Sang, L.; Chong, G. T.; Nuckolls, F.; Giangrande, P.; Wright, F. A.; Field, S. J.; Greenberg, M. E.; Orkin, S.; Nevins, J. R.; Robinson, M. L. und Leone, G. (2001): The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation, *Nature* (Band 414), Nr. 6862, Seite 457-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11719808
- [42] Johnson, D. G.; Schwarz, J. K.; Cress, W. D. und Nevins, J. R. (1993): Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase, *Nature* (Band 365), Nr. 6444, Seite 349-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8377827
- [43] DeGregori, J.; Leone, G.; Miron, A.; Jakoi, L. und Nevins, J. R. (1997): Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 14, Seite 7245-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207076
- [44] Rayman, J. B.; Takahashi, Y.; Indjeian, V. B.; Dannenberg, J. H.; Catchpole, S.; Watson, R. J.; te Riele, H. und Dynlacht, B. D. (2002): E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 8, Seite 933-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11959842
- [45] Takahashi, Y.; Rayman, J. B. und Dynlacht, B. D. (2000): Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 7, Seite 804-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10766737
- [46] de Bruin, A.; Maiti, B.; Jakoi, L.; Timmers, C.; Buerki, R. und Leone, G. (2003): Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 43, Seite 42041-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12893818
- [47] Di Stefano, L.; Jensen, M. R. und Helin, K. (2003): E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes, *Embo J* (Band 22), Nr. 23, Seite 6289-98. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14633988
- [48] Christensen, J.; Cloos, P.; Toftegaard, U.; Klinkenberg, D.; Bracken, A. P.; Trinh, E.; Heeran, M.; Di Stefano, L. und Helin, K. (2005): Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription, *Nucleic Acids Res* (Band 33), Nr. 17, Seite 5458-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16179649
- [49] Maiti, B.; Li, J.; de Bruin, A.; Gordon, F.; Timmers, C.; Opavsky, R.; Patil, K.; Tuttle, J.; Cleghorn, W. und Leone, G. (2005): Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 18, Seite 18211-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15722552
- [50] Helin, K.; Wu, C. L.; Fattaey, A. R.; Lees, J. A.; Dynlacht, B. D.; Ngwu, C. und Harlow, E. (1993): Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation, *Genes Dev* (Band 7), Nr. 10, Seite 1850-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8405995
- [51] Zhang, Y. und Chellappan, S. P. (1995): Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F, *Oncogene* (Band 10), Nr. 11, Seite 2085-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7784053
- [52] Vidal, M.; Braun, P.; Chen, E.; Boeke, J. D. und Harlow, E. (1996): Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 19, Seite 10321-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8816798
- [53] Hallstrom, T. C. und Nevins, J. R. (2006): Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis, *Genes Dev* (Band 20), Nr. 5, Seite 613-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16481464
- [54] Black, E. P.; Hallstrom, T.; Dressman, H. K.; West, M. und Nevins, J. R. (2005): Distinctions in the specificity of E2F function revealed by gene expression signatures, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 44, Seite 15948-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16249342
- [55] Friend, S. H.; Bernards, R.; Rogelj, S.; Weinberg, R. A.; Rapaport, J. M.; Albert, D. M. und Dryja, T. P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma, *Nature* (Band 323), Nr. 6089, Seite 643-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2877398
- [56] Godbout, R.; Dryja, T. P.; Squire, J.; Gallie, B. L. und Phillips, R. A. (1983): Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma, *Nature* (Band 304), Nr. 5925, Seite 451-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6877367

-
- [57] Benedict, W. F.; Murphree, A. L.; Banerjee, A.; Spina, C. A.; Sparkes, M. C. und Sparkes, R. S. (1983): Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene, *Science* (Band 219), Nr. 4587, Seite 973-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6336308
 - [58] Harbour, J. W.; Lai, S. L.; Whang-Peng, J.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. und Kaye, F. J. (1988): Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC, *Science* (Band 241), Nr. 4863, Seite 353-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2838909
 - [59] Horowitz, J. M.; Park, S. H.; Bogenmann, E.; Cheng, J. C.; Yandell, D. W.; Kaye, F. J.; Minna, J. D.; Dryja, T. P. und Weinberg, R. A. (1990): Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 7, Seite 2775-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2181449
 - [60] Sardet, C.; Vidal, M.; Cobrinik, D.; Geng, Y.; Onufryk, C.; Chen, A. und Weinberg, R. A. (1995): E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 6, Seite 2403-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7892279
 - [61] Hijmans, E. M.; Voorhoeve, P. M.; Beijersbergen, R. L.; van 't Veer, L. J. und Bernards, R. (1995): E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 6, Seite 3082-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7760804
 - [62] Moberg, K.; Starz, M. A. und Lees, J. A. (1996): E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry, *Mol Cell Biol* (Band 16), Nr. 4, Seite 1436-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8657117
 - [63] Morkel, M.; Wenkel, J.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. und Hagemeyer, C. (1997): An E2F-like repressor of transcription, *Nature* (Band 390), Nr. 6660, Seite 567-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9403682
 - [64] Ogawa, H.; Ishiguro, K.; Gaubatz, S.; Livingston, D. M. und Nakatani, Y. (2002): A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells, *Science* (Band 296), Nr. 5570, Seite 1132-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12004135
 - [65] Trimarchi, J. M.; Fairchild, B.; Wen, J. und Lees, J. A. (2001): The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 4, Seite 1519-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11171983
 - [66] Clarke, A. R.; Maandag, E. R.; van Roon, M.; van der Lugt, N. M.; van der Valk, M.; Hooper, M. L.; Berns, A. und te Riele, H. (1992): Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development, *Nature* (Band 359), Nr. 6393, Seite 328-30. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406937
- [67] Lee, E. Y.; Chang, C. Y.; Hu, N.; Wang, Y. C.; Lai, C. C.; Herrup, K.; Lee, W. H. und Bradley, A. (1992): Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis, *Nature* (Band 359), Nr. 6393, Seite 288-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406932
- [68] Wenzel, P. L.; Wu, L.; de Bruin, A.; Chong, J. L.; Chen, W. Y.; Dureska, G.; Sites, E.; Pan, T.; Sharma, A.; Huang, K.; Ridgway, R.; Mosaliganti, K.; Sharp, R.; Machiraju, R.; Saltz, J.; Yamamoto, H.; Cross, J. C.; Robinson, M. L. und Leone, G. (2007): Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population, *Genes Dev* (Band 21), Nr. 1, Seite 85-97. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210791
- [69] Wu, L.; de Bruin, A.; Saavedra, H. I.; Starovic, M.; Trimboli, A.; Yang, Y.; Opavska, J.; Wilson, P.; Thompson, J. C.; Ostrowski, M. C.; Rosol, T. J.; Woollett, L. A.; Weinstein, M.; Cross, J. C.; Robinson, M. L. und Leone, G. (2003): Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability, *Nature* (Band 421), Nr. 6926, Seite 942-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12607001
- [70] Cobrinik, D.; Lee, M. H.; Hannon, G.; Mulligan, G.; Bronson, R. T.; Dyson, N.; Harlow, E.; Beach, D.; Weinberg, R. A. und Jacks, T. (1996): Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 13, Seite 1633-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8682294
- [71] Lee, M. H.; Williams, B. O.; Mulligan, G.; Mukai, S.; Bronson, R. T.; Dyson, N.; Harlow, E. und Jacks, T. (1996): Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 13, Seite 1621-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8682293
- [72] Sage, J.; Mulligan, G. J.; Attardi, L. D.; Miller, A.; Chen, S.; Williams, B.; Theodorou, E. und Jacks, T. (2000): Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 23, Seite 3037-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11114892
- [73] Dannenberg, J. H.; van Rossum, A.; Schuijff, L. und te Riele, H. (2000): Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 23, Seite 3051-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11114893
- [74] Humbert, P. O.; Rogers, C.; Ganiatsas, S.; Landsberg, R. L.; Trimarchi, J. M.; Dandapani, S.; Brugnara, C.; Erdman, S.; Schrenzel, M.; Bronson, R. T. und Lees, J. A. (2000): E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability, *Mol Cell* (Band 6), Nr. 2, Seite 281-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10983976

-
- [75] Lindeman, G. J.; Dagnino, L.; Gaubatz, S.; Xu, Y.; Bronson, R. T.; Warren, H. B. und Livingston, D. M. (1998): A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 8, Seite 1092-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9553039
 - [76] Gaubatz, S.; Lindeman, G. J.; Ishida, S.; Jakoi, L.; Nevins, J. R.; Livingston, D. M. und Rempel, R. E. (2000): E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control, *Mol Cell* (Band 6), Nr. 3, Seite 729-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11030352
 - [77] Li, J.; Ran, C.; Li, E.; Gordon, F.; Comstock, G.; Siddiqui, H.; Cleghorn, W.; Chen, H. Z.; Kornacker, K.; Liu, C. G.; Pandit, S. K.; Khanizadeh, M.; Weinstein, M.; Leone, G. und de Bruin, A. (2008): Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development, *Dev Cell* (Band 14), Nr. 1, Seite 62-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18194653
 - [78] Humbert, P. O.; Verona, R.; Trimarchi, J. M.; Rogers, C.; Dandapani, S. und Lees, J. A. (2000): E2f3 is critical for normal cellular proliferation, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 6, Seite 690-703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10733529
 - [79] Leone, G.; DeGregori, J.; Yan, Z.; Jakoi, L.; Ishida, S.; Williams, R. S. und Nevins, J. R. (1998): E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase, *Genes Dev* (Band 12), Nr. 14, Seite 2120-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9679057
 - [80] Ziebold, U.; Reza, T.; Caron, A. und Lees, J. A. (2001): E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 4, Seite 386-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11230146
 - [81] Ziebold, U.; Lee, E. Y.; Bronson, R. T. und Lees, J. A. (2003): E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas, *Mol Cell Biol* (Band 23), Nr. 18, Seite 6542-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12944480
 - [82] Field, S. J.; Tsai, F. Y.; Kuo, F.; Zubiaga, A. M.; Kaelin, W. G., Jr.; Livingston, D. M.; Orkin, S. H. und Greenberg, M. E. (1996): E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation, *Cell* (Band 85), Nr. 4, Seite 549-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653790
 - [83] Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E. und Dyson, N. J. (1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1, *Cell* (Band 85), Nr. 4, Seite 537-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8653789
 - [84] Murga, M.; Fernandez-Capetillo, O.; Field, S. J.; Moreno, B.; Borlado, L. R.; Fujiwara, Y.; Balomenos, D.; Vicario, A.; Carrera, A. C.; Orkin, S. H.; Greenberg, M. E. und Zubiaga, A. M. (2001): Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation

- ration, leading to the development of autoimmunity, *Immunity* (Band 15), Nr. 6, Seite 959-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11754817
- [85] Leone, G.; Nuckolls, F.; Ishida, S.; Adams, M.; Sears, R.; Jakoi, L.; Miron, A. und Nevins, J. R. (2000): Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 10, Seite 3626-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779352
- [86] He, Y.; Armanious, M. K.; Thomas, M. J. und Cress, W. D. (2000): Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region, *Oncogene* (Band 19), Nr. 30, Seite 3422-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10918599
- [87] Adams, M. R.; Sears, R.; Nuckolls, F.; Leone, G. und Nevins, J. R. (2000): Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus, *Mol Cell Biol* (Band 20), Nr. 10, Seite 3633-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779353
- [88] Aslanian, A.; Iaquinta, P. J.; Verona, R. und Lees, J. A. (2004): Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics, *Genes Dev* (Band 18), Nr. 12, Seite 1413-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15175242
- [89] Tsai, S. Y.; Opavsky, R.; Sharma, N.; Wu, L.; Naidu, S.; Nolan, E.; Feria-Arias, E.; Timmers, C.; Opavska, J.; de Bruin, A.; Chong, J. L.; Trikha, P.; Fernandez, S. A.; Stromberg, P.; Rosol, T. J. und Leone, G. (2008): Mouse development with a single E2F activator, *Nature* (Band 454), Nr. 7208, Seite 1137-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18594513
- [90] Danielian, P. S.; Friesenhahn, L. B.; Faust, A. M.; West, J. C.; Caron, A. M.; Bronson, R. T. und Lees, J. A. (2008): E2f3a and E2f3b make overlapping but different contributions to total E2f3 activity, *Oncogene* (Band 27), Nr. 51, Seite 6561-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18663357
- [91] Matheu, A.; Maraver, A. und Serrano, M. (2008): The Arf/p53 pathway in cancer and aging, *Cancer Res* (Band 68), Nr. 15, Seite 6031-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18676821
- [92] Chong, J. L.; Tsai, S. Y.; Sharma, N.; Opavsky, R.; Price, R.; Wu, L.; Fernandez, S. A. und Leone, G. (2009): E2f3a and E2f3b contribute to the control of cell proliferation and mouse development, *Mol Cell Biol* (Band 29), Nr. 2, Seite 414-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19015245
- [93] Muller, H.; Bracken, A. P.; Vernell, R.; Moroni, M. C.; Christians, F.; Grassilli, E.; Prosperini, E.; Vigo, E.; Oliner, J. D. und Helin, K. (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 3, Seite 267-85. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159908
- [94] Ishida, S.; Huang, E.; Zuzan, H.; Spang, R.; Leone, G.; West, M. und Nevins, J. R. (2001): Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis, *Mol Cell Biol* (Band 21), Nr. 14, Seite 4684-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11416145
- [95] Weinmann, A. S.; Yan, P. S.; Oberley, M. J.; Huang, T. H. und Farnham, P. J. (2002): Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 2, Seite 235-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11799066
- [96] Xu, X.; Bieda, M.; Jin, V. X.; Rabinovich, A.; Oberley, M. J.; Green, R. und Farnham, P. J. (2007): A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members, *Genome Res* (Band 17), Nr. 11, Seite 1550-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17908821
- [97] Cam, H.; Balciunaite, E.; Blais, A.; Spektor, A.; Scarpulla, R. C.; Young, R.; Kluger, Y. und Dynlacht, B. D. (2004): A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition, *Mol Cell* (Band 16), Nr. 3, Seite 399-411. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15525513
- [98] Ren, B.; Cam, H.; Takahashi, Y.; Volkert, T.; Terragni, J.; Young, R. A. und Dynlacht, B. D. (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 2, Seite 245-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11799067
- [99] Sylvestre, Y.; De Guire, V.; Querido, E.; Mukhopadhyay, U. K.; Bourdeau, V.; Major, F.; Ferbeyre, G. und Chartrand, P. (2007): An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 4, Seite 2135-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17135249
- [100] Asp, P.; Acosta-Alvear, D.; Tsikitis, M.; van Oevelen, C. und Dynlacht, B. D. (2009): E2f3b plays an essential role in myogenic differentiation through isoform-specific gene regulation, *Genes Dev* (Band 23), Nr. 1, Seite 37-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19136625
- [101] Kornberg, R. D. (1974): Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science* (Band 184), Nr. 139, Seite 868-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4825889
- [102] Kouzarides, T. (2007): Chromatin modifications and their function, *Cell* (Band 128), Nr. 4, Seite 693-705. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17320507
- [103] Kuo, M. H.; Brownell, J. E.; Sobel, R. E.; Ranalli, T. A.; Cook, R. G.; Edmondson, D. G.; Roth, S. Y. und Allis, C. D. (1996): Transcription-linked acetylation by Gcn5p of

- histones H3 and H4 at specific lysines, *Nature* (Band 383), Nr. 6597, Seite 269-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8805705
- [104] Jacobson, R. H.; Ladurner, A. G.; King, D. S. und Tjian, R. (2000): Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module, *Science* (Band 288), Nr. 5470, Seite 1422-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10827952
- [105] Agger, K.; Christensen, J.; Cloos, P. A. und Helin, K. (2008): The emerging functions of histone demethylases, *Curr Opin Genet Dev* (Band 18), Nr. 2, Seite 159-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18281209
- [106] Litt, M. D.; Simpson, M.; Gaszner, M.; Allis, C. D. und Felsenfeld, G. (2001): Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus, *Science* (Band 293), Nr. 5539, Seite 2453-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11498546
- [107] Santos-Rosa, H.; Schneider, R.; Bannister, A. J.; Sherriff, J.; Bernstein, B. E.; Emre, N. C.; Schreiber, S. L.; Mellor, J. und Kouzarides, T. (2002): Active genes are trimethylated at K4 of histone H3, *Nature* (Band 419), Nr. 6905, Seite 407-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12353038
- [108] Vermeulen, M.; Mulder, K. W.; Denissov, S.; Pijnappel, W. W.; van Schaik, F. M.; Varier, R. A.; Baltissen, M. P.; Stunnenberg, H. G.; Mann, M. und Timmers, H. T. (2007): Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4, *Cell* (Band 131), Nr. 1, Seite 58-69. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17884155
- [109] Trimarchi, J. M. und Lees, J. A. (2002): Sibling rivalry in the E2F family, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 3), Nr. 1, Seite 11-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11823794
- [110] Blais, A. und Dynlacht, B. D. (2007): E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control, *Curr Opin Cell Biol* (Band 19), Nr. 6, Seite 658-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18023996
- [111] Nicolas, E.; Roumillac, C. und Trouche, D. (2003): Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter, *Mol Cell Biol* (Band 23), Nr. 5, Seite 1614-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12588981
- [112] Nielsen, S. J.; Schneider, R.; Bauer, U. M.; Bannister, A. J.; Morrison, A.; O'Carroll, D.; Firestein, R.; Cleary, M.; Jenuwein, T.; Herrera, R. E. und Kouzarides, T. (2001): Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters, *Nature* (Band 412), Nr. 6846, Seite 561-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11484059
- [113] Vandel, L.; Nicolas, E.; Vaute, O.; Ferreira, R.; Ait-Si-Ali, S. und Trouche, D. (2001): Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a

- histone methyltransferase, Mol Cell Biol (Band 21), Nr. 19, Seite 6484-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11533237
- [114] Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Narita, M.; Lin, A. W.; Hearn, S. A.; Spector, D. L.; Hannon, G. J. und Lowe, S. W. (2003): Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence, Cell (Band 113), Nr. 6, Seite 703-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12809602
- [115] Gaubatz, S.; Lees, J. A.; Lindeman, G. J. und Livingston, D. M. (2001): E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner, Mol Cell Biol (Band 21), Nr. 4, Seite 1384-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11158323
- [116] Apostolova, M. D.; Ivanova, I. A.; Dagnino, C.; D'Souza, S. J. und Dagnino, L. (2002): Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization, J Biol Chem (Band 277), Nr. 37, Seite 34471-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12089160
- [117] Taubert, S.; Gorrini, C.; Frank, S. R.; Parisi, T.; Fuchs, M.; Chan, H. M.; Livingston, D. M. und Amati, B. (2004): E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1, Mol Cell Biol (Band 24), Nr. 10, Seite 4546-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15121871
- [118] Tyagi, S.; Chabes, A. L.; Wysocka, J. und Herr, W. (2007): E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases, Mol Cell (Band 27), Nr. 1, Seite 107-19. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17612494
- [119] Khavari, P. A.; Peterson, C. L.; Tamkun, J. W.; Mendel, D. B. und Crabtree, G. R. (1993): BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription, Nature (Band 366), Nr. 6451, Seite 170-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8232556
- [120] Cairns, B. R.; Lorch, Y.; Li, Y.; Zhang, M.; Lacomis, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Du, J.; Laurent, B. und Kornberg, R. D. (1996): RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex, Cell (Band 87), Nr. 7, Seite 1249-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8980231
- [121] Clapier, C. R. und Cairns, B. R. (2009): The biology of chromatin remodeling complexes, Annu Rev Biochem (Band 78), Seite 273-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19355820
- [122] Whitehouse, I.; Flaus, A.; Cairns, B. R.; White, M. F.; Workman, J. L. und Owen-Hughes, T. (1999): Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex, Nature (Band 400), Nr. 6746, Seite 784-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10466730

-
- [123] Owen-Hughes, T.; Utley, R. T.; Cote, J.; Peterson, C. L. und Workman, J. L. (1996): Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex, *Science* (Band 273), Nr. 5274, Seite 513-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8662543
 - [124] Schnitzler, G.; Sif, S. und Kingston, R. E. (1998): Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state, *Cell* (Band 94), Nr. 1, Seite 17-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9674423
 - [125] Mizuguchi, G.; Shen, X.; Landry, J.; Wu, W. H.; Sen, S. und Wu, C. (2004): ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex, *Science* (Band 303), Nr. 5656, Seite 343-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14645854
 - [126] Zhang, H.; Roberts, D. N. und Cairns, B. R. (2005): Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss, *Cell* (Band 123), Nr. 2, Seite 219-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16239141
 - [127] Raisner, R. M.; Hartley, P. D.; Meneghini, M. D.; Bao, M. Z.; Liu, C. L.; Schreiber, S. L.; Rando, O. J. und Madhani, H. D. (2005): Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin, *Cell* (Band 123), Nr. 2, Seite 233-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16239142
 - [128] Geiman, T. M.; Durum, S. K. und Muegge, K. (1998): Characterization of gene expression, genomic structure, and chromosomal localization of Hells (Lsh), *Genomics* (Band 54), Nr. 3, Seite 477-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9878251
 - [129] Kowenz-Leutz, E. und Leutz, A. (1999): A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes, *Mol Cell* (Band 4), Nr. 5, Seite 735-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10619021
 - [130] Dunaief, J. L.; Strober, B. E.; Guha, S.; Khavari, P. A.; Alin, K.; Luban, J.; Begemann, M.; Crabtree, G. R. und Goff, S. P. (1994): The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest, *Cell* (Band 79), Nr. 1, Seite 119-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7923370
 - [131] Zhang, H. S.; Gavin, M.; Dahiya, A.; Postigo, A. A.; Ma, D.; Luo, R. X.; Harbour, J. W. und Dean, D. C. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF, *Cell* (Band 101), Nr. 1, Seite 79-89. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10778858
 - [132] Imbalzano, A. N.; Kwon, H.; Green, M. R. und Kingston, R. E. (1994): Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA, *Nature* (Band 370), Nr. 6489, Seite 481-5. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8047170
- [133] Jarvis, C. D.; Geiman, T.; Vila-Storm, M. P.; Osipovich, O.; Akella, U.; Candeias, S.; Nathan, I.; Durum, S. K. und Muegge, K. (1996): A novel putative helicase produced in early murine lymphocytes, *Gene* (Band 169), Nr. 2, Seite 203-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8647447
- [134] Geiman, T. M.; Tessarollo, L.; Anver, M. R.; Kopp, J. B.; Ward, J. M. und Muegge, K. (2001): Lsh, a SNF2 family member, is required for normal murine development, *Biochim Biophys Acta* (Band 1526), Nr. 2, Seite 211-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11325543
- [135] De La Fuente, R.; Baumann, C.; Fan, T.; Schmidtman, A.; Dobrinski, I. und Muegge, K. (2006): Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 12, Seite 1448-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17115026
- [136] Suzuki, T.; Farrar, J. E.; Yegnasubramanian, S.; Zahed, M.; Suzuki, N. und Arceci, R. J. (2008): Stable knockdown of PASG enhances DNA demethylation but does not accelerate cellular senescence in TIG-7 human fibroblasts, *Epigenetics* (Band 3), Nr. 5, Seite 281-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18948754
- [137] Raabe, E. H.; Abdurrahman, L.; Behbehani, G. und Arceci, R. J. (2001): An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation, *Dev Dyn* (Band 221), Nr. 1, Seite 92-105. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11357197
- [138] Myant, K. und Stancheva, I. (2008): LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription, *Mol Cell Biol* (Band 28), Nr. 1, Seite 215-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17967891
- [139] Xi, S.; Zhu, H.; Xu, H.; Schmidtman, A.; Geiman, T. M. und Muegge, K. (2007): Lsh controls Hox gene silencing during development, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 36, Seite 14366-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17726103
- [140] Sun, L. Q.; Lee, D. W.; Zhang, Q.; Xiao, W.; Raabe, E. H.; Meeker, A.; Miao, D.; Huso, D. L. und Arceci, R. J. (2004): Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG, *Genes Dev* (Band 18), Nr. 9, Seite 1035-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15105378
- [141] Dennis, K.; Fan, T.; Geiman, T.; Yan, Q. und Muegge, K. (2001): Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 22, Seite 2940-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11711429
- [142] Zhu, H.; Geiman, T. M.; Xi, S.; Jiang, Q.; Schmidtman, A.; Chen, T.; Li, E. und Muegge, K. (2006): Lsh is involved in de novo methylation of DNA, *Embo J* (Band

- 25), Nr. 2, Seite 335-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16395332
- [143] Fan, T.; Hagan, J. P.; Kozlov, S. V.; Stewart, C. L. und Muegge, K. (2005): Lsh controls silencing of the imprinted Cdkn1c gene, *Development* (Band 132), Nr. 4, Seite 635-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15647320
- [144] Brzeski, J. und Jerzmanowski, A. (2003): Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 2, Seite 823-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12403775
- [145] Foster, C. S.; Falconer, A.; Dodson, A. R.; Norman, A. R.; Dennis, N.; Fletcher, A.; Southgate, C.; Dowe, A.; Dearnaley, D.; Jhavar, S.; Eeles, R.; Feber, A. und Cooper, C. S. (2004): Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome, *Oncogene* (Band 23), Nr. 35, Seite 5871-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15184867
- [146] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063
- [147] Hsu, S. I.; Yang, C. M.; Sim, K. G.; Hentschel, D. M.; O'Leary, E. und Bonventre, J. V. (2001): TRIP-Br: a novel family of PHD zinc finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1, *Embo J* (Band 20), Nr. 9, Seite 2273-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11331592
- [148] Wang, C.; Rauscher, F. J., 3rd; Cress, W. D. und Chen, J. (2007): Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 41, Seite 29902-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17704056
- [149] McMahon, S. B.; Van Buskirk, H. A.; Dugan, K. A.; Copeland, T. D. und Cole, M. D. (1998): The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins, *Cell* (Band 94), Nr. 3, Seite 363-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9708738
- [150] Lewis, P. W.; Beall, E. L.; Fleischer, T. C.; Georlette, D.; Link, A. J. und Botchan, M. R. (2004): Identification of a Drosophila Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex, *Genes Dev* (Band 18), Nr. 23, Seite 2929-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15545624
- [151] Geiman, T. M. und Muegge, K. (2000): Lsh, an SNF2/helicase family member, is required for proliferation of mature T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 9, Seite 4772-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10781083

-
- [152] Osterloh, L.; von Eyss, B.; Schmit, F.; Rein, L.; Hubner, D.; Samans, B.; Hauser, S. und Gaubatz, S. (2007): The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis, *Embo J* (Band 26), Nr. 1, Seite 144-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17159899
- [153] Vigo, E.; Muller, H.; Prosperini, E.; Hateboer, G.; Cartwright, P.; Moroni, M. C. und Helin, K. (1999): CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase, *Mol Cell Biol* (Band 19), Nr. 9, Seite 6379-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10454584
- [154] Littlewood, T. D.; Hancock, D. C.; Danielian, P. S.; Parker, M. G. und Evan, G. I. (1995): A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins, *Nucleic Acids Res* (Band 23), Nr. 10, Seite 1686-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7784172
- [155] Yan, Q.; Cho, E.; Lockett, S. und Muegge, K. (2003): Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin, *Mol Cell Biol* (Band 23), Nr. 23, Seite 8416-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612388
- [156] Yan, Q.; Huang, J.; Fan, T.; Zhu, H. und Muegge, K. (2003): Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation, *Embo J* (Band 22), Nr. 19, Seite 5154-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14517253
- [157] Zhu, W.; Giangrande, P. H. und Nevins, J. R. (2004): E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription, *Embo J* (Band 23), Nr. 23, Seite 4615-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15510213
- [158] Balciunaite, E.; Spektor, A.; Lents, N. H.; Cam, H.; Te Riele, H.; Scime, A.; Rudnicki, M. A.; Young, R. und Dynlacht, B. D. (2005): Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells, *Mol Cell Biol* (Band 25), Nr. 18, Seite 8166-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16135806
- [159] Solomon, D. A.; Kim, J. S.; Jenkins, S.; Ransom, H.; Huang, M.; Coppa, N.; Mabanta, L.; Bigner, D.; Yan, H.; Jean, W. und Waldman, T. (2008): Identification of p18 INK4c as a tumor suppressor gene in glioblastoma multiforme, *Cancer Res* (Band 68), Nr. 8, Seite 2564-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18381405
- [160] Yin, D.; Zhou, H.; Kumagai, T.; Liu, G.; Ong, J. M.; Black, K. L. und Koeffler, H. P. (2005): Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM), *Oncogene* (Band 24), Nr. 3, Seite 344-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15531918
- [161] Saadatmandi, N.; Tyler, T.; Huang, Y.; Haghighi, A.; Frost, G.; Borgstrom, P. und Gjerset, R. A. (2002): Growth suppression by a p14(ARF) exon 1beta adenovirus in

- human tumor cell lines of varying p53 and Rb status, *Cancer Gene Ther* (Band 9), Nr. 10, Seite 830-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12224024
- [162] Lee, D. W.; Zhang, K.; Ning, Z. Q.; Raabe, E. H.; Tintner, S.; Wieland, R.; Wilkins, B. J.; Kim, J. M.; Blough, R. I. und Arceci, R. J. (2000): Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 13, Seite 3612-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10910076
- [163] Kitagawa, M.; Higashi, H.; Jung, H. K.; Suzuki-Takahashi, I.; Ikeda, M.; Tamai, K.; Kato, J.; Segawa, K.; Yoshida, E.; Nishimura, S. und Taya, Y. (1996): The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2, *Embo J* (Band 15), Nr. 24, Seite 7060-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9003781
- [164] Geng, Y.; Yu, Q.; Whoriskey, W.; Dick, F.; Tsai, K. Y.; Ford, H. L.; Biswas, D. K.; Pardee, A. B.; Amati, B.; Jacks, T.; Richardson, A.; Dyson, N. und Sicinski, P. (2001): Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 23, Seite 13138-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11687642
- [165] Kramps, C.; Strieder, V.; Sapetschnig, A.; Suske, G. und Lutz, W. (2004): E2F and Sp1/Sp3 Synergize but are not sufficient to activate the MYCN gene in neuroblastomas, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 7, Seite 5110-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14645238
- [166] Moroni, M. C.; Hickman, E. S.; Lazzerini Denchi, E.; Caprara, G.; Colli, E.; Cecconi, F.; Muller, H. und Helin, K. (2001): Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol* (Band 3), Nr. 6, Seite 552-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11389439
- [167] Hurford, R. K., Jr.; Cobrinik, D.; Lee, M. H. und Dyson, N. (1997): pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 11, Seite 1447-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9192872
- [168] Lam, E. W. und Watson, R. J. (1993): An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription, *Embo J* (Band 12), Nr. 7, Seite 2705-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8334989
- [169] Cooper, C. S.; Nicholson, A. G.; Foster, C.; Dodson, A.; Edwards, S.; Fletcher, A.; Roe, T.; Clark, J.; Joshi, A.; Norman, A.; Feber, A.; Lin, D.; Gao, Y.; Shipley, J. und Cheng, S. J. (2006): Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer, *Lung Cancer* (Band 54), Nr. 2, Seite 155-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16938365
- [170] Feber, A.; Clark, J.; Goodwin, G.; Dodson, A. R.; Smith, P. H.; Fletcher, A.; Edwards, S.; Flohr, P.; Falconer, A.; Roe, T.; Kovacs, G.; Dennis, N.; Fisher, C.; Wooster, R.;

- Huddart, R.; Foster, C. S. und Cooper, C. S. (2004): Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer, *Oncogene* (Band 23), Nr. 8, Seite 1627-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14716298
- [171] Johnson, D. S.; Mortazavi, A.; Myers, R. M. und Wold, B. (2007): Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions, *Science* (Band 316), Nr. 5830, Seite 1497-502. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17540862
- [172] Elkon, R.; Linhart, C.; Sharan, R.; Shamir, R. und Shiloh, Y. (2003): Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells, *Genome Res* (Band 13), Nr. 5, Seite 773-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12727897
- [173] Woods, K.; Thomson, J. M. und Hammond, S. M. (2007): Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 4, Seite 2130-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17135268
- [174] O'Donnell, K. A.; Wentzel, E. A.; Zeller, K. I.; Dang, C. V. und Mendell, J. T. (2005): c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression, *Nature* (Band 435), Nr. 7043, Seite 839-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15944709
- [175] Marson, A.; Levine, S. S.; Cole, M. F.; Frampton, G. M.; Brambrink, T.; Johnstone, S.; Guenther, M. G.; Johnston, W. K.; Wernig, M.; Newman, J.; Calabrese, J. M.; Dennis, L. M.; Volkert, T. L.; Gupta, S.; Love, J.; Hannett, N.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P.; Jaenisch, R. und Young, R. A. (2008): Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells, *Cell* (Band 134), Nr. 3, Seite 521-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18692474
- [176] Bernstein, B. E.; Kamal, M.; Lindblad-Toh, K.; Bekiranov, S.; Bailey, D. K.; Huebert, D. J.; McMahon, S.; Karlsson, E. K.; Kulbokas, E. J., 3rd; Gingeras, T. R.; Schreiber, S. L. und Lander, E. S. (2005): Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse, *Cell* (Band 120), Nr. 2, Seite 169-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15680324
- [177] Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K.; Roh, T. Y.; Schones, D. E.; Wang, Z.; Wei, G.; Chepelev, I. und Zhao, K. (2007): High-resolution profiling of histone methylations in the human genome, *Cell* (Band 129), Nr. 4, Seite 823-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17512414
- [178] Gregory, R. I.; Yan, K. P.; Amuthan, G.; Chendrimada, T.; Doratotaj, B.; Cooch, N. und Shiekhattar, R. (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs, *Nature* (Band 432), Nr. 7014, Seite 235-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15531877

-
- [179] Yi, R.; Qin, Y.; Macara, I. G. und Cullen, B. R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev* (Band 17), Nr. 24, Seite 3011-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14681208
 - [180] Lund, E.; Guttinger, S.; Calado, A.; Dahlberg, J. E. und Kutay, U. (2004): Nuclear export of microRNA precursors, *Science* (Band 303), Nr. 5654, Seite 95-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14631048
 - [181] Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M. und Hannon, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* (Band 409), Nr. 6818, Seite 363-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11201747
 - [182] Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Luhrmann, R. und Tuschl, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi, *Cell* (Band 110), Nr. 5, Seite 563-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12230974
 - [183] Robb, G. B. und Rana, T. M. (2007): RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading, *Mol Cell* (Band 26), Nr. 4, Seite 523-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17531811
 - [184] Eberharter, A.; Sterner, D. E.; Schieltz, D.; Hassan, A.; Yates, J. R., 3rd; Berger, S. L. und Workman, J. L. (1999): The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* (Band 19), Nr. 10, Seite 6621-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490601
 - [185] Lang, S. E.; McMahon, S. B.; Cole, M. D. und Hearing, P. (2001): E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 35, Seite 32627-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11418595
 - [186] Fan, T.; Yan, Q.; Huang, J.; Austin, S.; Cho, E.; Ferris, D. und Muegge, K. (2003): Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis, *Cancer Res* (Band 63), Nr. 15, Seite 4677-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12907649
 - [187] Saavedra, H. I.; Maiti, B.; Timmers, C.; Altura, R.; Tokuyama, Y.; Fukasawa, K. und Leone, G. (2003): Inactivation of E2F3 results in centrosome amplification, *Cancer Cell* (Band 3), Nr. 4, Seite 333-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12726860
 - [188] Giangrande, P. H.; Hallstrom, T. C.; Tunyaplin, C.; Calame, K. und Nevins, J. R. (2003): Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor, *Mol Cell Biol* (Band 23), Nr. 11, Seite 3707-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12748276

-
- [189] Giangrande, P. H.; Zhu, W.; Rempel, R. E.; Laakso, N. und Nevins, J. R. (2004): Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members, *Embo J* (Band 23), Nr. 6, Seite 1336-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15014447
 - [190] Schlisio, S.; Halperin, T.; Vidal, M. und Nevins, J. R. (2002): Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function, *Embo J* (Band 21), Nr. 21, Seite 5775-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12411495
 - [191] Pray-Grant, M. G.; Daniel, J. A.; Schieltz, D.; Yates, J. R., 3rd und Grant, P. A. (2005): Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation, *Nature* (Band 433), Nr. 7024, Seite 434-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15647753
 - [192] Kobor, M. S.; Venkatasubrahmanyam, S.; Meneghini, M. D.; Gin, J. W.; Jennings, J. L.; Link, A. J.; Madhani, H. D. und Rine, J. (2004): A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin, *PLoS Biol* (Band 2), Nr. 5, Seite E131. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15045029
 - [193] Krogan, N. J.; Keogh, M. C.; Datta, N.; Sawa, C.; Ryan, O. W.; Ding, H.; Haw, R. A.; Pootoolal, J.; Tong, A.; Canadien, V.; Richards, D. P.; Wu, X.; Emili, A.; Hughes, T. R.; Buratowski, S. und Greenblatt, J. F. (2003): A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1, *Mol Cell* (Band 12), Nr. 6, Seite 1565-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14690608
 - [194] Liang, C.; Weinreich, M. und Stillman, B. (1995): ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome, *Cell* (Band 81), Nr. 5, Seite 667-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7774008
 - [195] Leone, G.; Sears, R.; Huang, E.; Rempel, R.; Nuckolls, F.; Park, C. H.; Giangrande, P.; Wu, L.; Saavedra, H. I.; Field, S. J.; Thompson, M. A.; Yang, H.; Fujiwara, Y.; Greenberg, M. E.; Orkin, S.; Smith, C. und Nevins, J. R. (2001): Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis, *Mol Cell* (Band 8), Nr. 1, Seite 105-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11511364
 - [196] Xu, G.; Livingston, D. M. und Krek, W. (1995): Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 5, Seite 1357-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7877982
 - [197] Paulson, Q. X.; McArthur, M. J. und Johnson, D. G. (2006): E2F3a stimulates proliferation, p53-independent apoptosis and carcinogenesis in a transgenic mouse model, *Cell Cycle* (Band 5), Nr. 2, Seite 184-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16340309

-
- [198] Parisi, T.; Yuan, T. L.; Faust, A. M.; Caron, A. M.; Bronson, R. und Lees, J. A. (2007): Selective requirements for E2f3 in the development and tumorigenicity of Rb-deficient chimeric tissues, *Mol Cell Biol* (Band 27), Nr. 6, Seite 2283-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210634
- [199] Olsson, A. Y.; Feber, A.; Edwards, S.; Te Poele, R.; Giddings, I.; Merson, S. und Cooper, C. S. (2007): Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells, *Oncogene* (Band 26), Nr. 7, Seite 1028-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16909110
- [200] Hurst, C. D.; Tomlinson, D. C.; Williams, S. V.; Platt, F. M. und Knowles, M. A. (2008): Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification, *Oncogene* (Band 27), Nr. 19, Seite 2716-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18037967
- [201] Muegge, K. (2005): Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements, *Biochem Cell Biol* (Band 83), Nr. 4, Seite 548-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16094458
- [202] DeGregori, J.; Kowalik, T. und Nevins, J. R. (1995): Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 8, Seite 4215-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7623816
- [203] Yao, G.; Lee, T. J.; Mori, S.; Nevins, J. R. und You, L. (2008): A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point, *Nat Cell Biol* (Band 10), Nr. 4, Seite 476-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18364697
- [204] Mudhasani, R.; Zhu, Z.; Hutvagner, G.; Eischen, C. M.; Lyle, S.; Hall, L. L.; Lawrence, J. B.; Imbalzano, A. N. und Jones, S. N. (2008): Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells, *J Cell Biol* (Band 181), Nr. 7, Seite 1055-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18591425
- [205] Selbach, M.; Schwanhauss, B.; Thierfelder, N.; Fang, Z.; Khanin, R. und Rajewsky, N. (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature* (Band 455), Nr. 7209, Seite 58-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18668040
- [206] Baek, D.; Villen, J.; Shin, C.; Camargo, F. D.; Gygi, S. P. und Bartel, D. P. (2008): The impact of microRNAs on protein output, *Nature* (Band 455), Nr. 7209, Seite 64-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18668037
- [207] Petrocca, F.; Visone, R.; Onelli, M. R.; Shah, M. H.; Nicoloso, M. S.; de Martino, I.; Iliopoulos, D.; Piloizzi, E.; Liu, C. G.; Negrini, M.; Cavazzini, L.; Volinia, S.; Alder, H.; Ruco, L. P.; Baldassarre, G.; Croce, C. M. und Vecchione, A. (2008): E2F1-regulated

microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer, Cancer Cell (Band 13), Nr. 3, Seite 272-86. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18328430